



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2015

**Rafaela Fernandes  
Félix**

**Avaliação da Viabilidade da Aplicação de Técnicas  
Biomoleculares na Autenticação de Produtos  
Alimentares**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Rafaela Fernandes  
Félix**

**Avaliação da Viabilidade da Aplicação de Técnicas  
Biomoleculares na Autenticação de Produtos  
Alimentares**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

Presidente

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado  
Equiparado a investigador principal da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Luís Manuel Souto de Miranda  
Professor auxiliar convidado da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Ao Professor Doutor Luís Souto pela oportunidade de integrar a sua equipa.

À Filipa e à Helena pelos inúmeros momentos partilhados, pela paciência, disponibilidade e entusiasmo que sempre mostraram. Foram incansáveis.

À Sílvia, uma amiga inesperada. Obrigada pela companhia, pela força, pelos conselhos e motivação constantes. Foste essencial.

Ao senhor Paulo e à dona Susana, pela confiança e pela simpatia com que sempre me receberam.

À Juliana pelos poucos mas bons momentos que passamos juntas. Muita sorte para o desafio que te espera.

À Guida e à Soraia. Meninas, que dizer? Foram tantas as peripécias. Conseguiram trazer alegria estes dois anos complicados. Obrigada por tudo. As conversas, as surpresas, os jantares de família, os momentos mais difíceis... Vou ter saudades.

À minha família, em especial aos meus avós.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo otimismo e força que transmitem. Pelo carinho e amor constantes. Por estarem sempre presentes.

À minha irmã, pelos momentos únicos e cumplicidade que partilhamos. Pela pessoa íntegra e meiga que és. Por te teres tornado num exemplo de perseverança para mim.

## palavras-chave

Fraude Alimentar, Autenticidade, Rastreabilidade, Rotulagem, Produtos Cárneos, PCR, ADN, Extração de ADN

## Resumo

A carne continua a ser a fonte proteica mais comum no quotidiano das pessoas. Além disso, os produtos cárneos processados apresentam-se como uma mais-valia nas suas vidas agitadas. Este tipo de produto torna difícil a diferenciação das carnes utilizadas na sua confecção, sendo por isso propícios a adulteração.

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) tem ganho cada vez mais importância nos laboratórios de biologia molecular, revelando-se uma técnica de análise rápida, sensível e altamente específica na identificação de espécies em produtos alimentares.

No entanto, vários factores podem interferir com o processo de amplificação, pelo que alguns cuidados devem ser implementados desde a aquisição da amostra a analisar, ao seu acondicionamento e posterior extração de ADN.

Existem inúmeros protocolos de extração de ADN, devendo para cada estudo avaliar-se e optar-se pelo mais adequado, considerando a finalidade estabelecida para a amostra extraída.

O trabalho laboratorial apresentado nesta dissertação baseou-se em três etapas principais. Inicialmente, avaliaram-se diferentes protocolos de extração de ADN, utilizando-se amostras de carne adquiridas num talho. Entre os protocolos testados, o método de Brometo de Cetil-Trimetil-Amónio (CTAB) modificado foi o que permitiu obter amostras de ADN com maior concentração e elevado nível de pureza.

Posteriormente, foram testados e otimizados diferentes protocolos de amplificação, por PCR em tempo real, para a detecção das espécies *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (porco), *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha). Foram empregues *primers* específicos de espécie para a detecção de genes mitocondriais e genómicos, consoante cada protocolo. Para o caso concreto do porco, foi efectuada a avaliação de dois protocolos, singleplex com EvaGreen® e tetraplex com AllHorse, para possível aplicação dos mesmos na sua quantificação. Os resultados demonstraram elevada especificidade e sensibilidade das reacções para esta espécie, permitindo a sua detecção até um limite de 0,001 ng e 0,1%, respectivamente. Somente a primeira metodologia se mostrou adequada para quantificação.

Por último, as metodologias sugeridas foram aplicadas com sucesso na análise de 4 amostras comerciais de hambúrgueres, tendo-se verificado a consistência da rotulagem em todos os casos, no que concerne a composição em termos de espécies animais.

O interesse de trabalhos neste âmbito recai na importância da autenticidade dos rótulos de produtos alimentares, principalmente nos produtos cárneos, para segurança dos consumidores e salvaguarda dos produtores.

## keywords

Food Fraud, Authenticity, Traceability, Labelling, Meat Products, PCR, DNA, DNA Extraction

## abstract

Meat remains the most common protein source in people's everyday lives. In addition, processed meat products represent an asset in their hectic state of living. In this type of product it is difficult to identify the different meat species used in its manufacture and therefore they are prone to food fraud.

Polymerase Chain Reaction (PCR) has gained increasing importance in molecular biology laboratories, revealing its suitability for rapid, sensitive and highly specific analysis of species identification in food products.

However, several factors can interfere with the amplification process. Hence some precaution procedures must be implemented since the acquisition of the test sample, to its conditioning and subsequent DNA extraction process.

There are numerous DNA extraction protocols and for each study a number of methods shall be evaluated so the most appropriate will be selected, considering the subsequent purpose of the extracted DNA sample.

The laboratory work presented in this thesis was based on three main steps. Initially, different DNA extraction protocols were evaluated. The modified Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) method showed the best results considering DNA yield and purity.

Subsequently, several amplification protocols were tested and optimized, for real time PCR detection of *Bos taurus* (beef), *Sus scrofa* (pork), *Equus caballus* (horse) and *Ovis aries* (sheep) species. Species specific primers were used for detection of mitochondrial and genomic genes, according to each protocol. In the particular case of *Sus scrofa* species, two protocols were tested for their quantification accuracy, a singleplex based on EvaGreen® detection and a tetraplex based on AllHorse amplification kit. The results demonstrated high specificity and sensitivity for both reactions, allowing a LOD of 0.001 ng and 0.1%, respectively. Only the first of the two tested methodologies proved to be accurate for DNA quantification.

Finally, the suggested methods were successfully applied to the analysis of four hamburgers commercial samples. All checked for the consistency of labeling regarding animal species composition.

The interest of this work in this area lies in the importance of authenticity of food labels, especially in meat products, for consumer safety and producers protection.

## Abreviaturas

% - Percentagem  
μL – Microlitro  
°C – Graus Celsius  
A – Adenina  
ADN – ácido desoxirribonucleico  
ARN – ácido ribonucleico  
ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica  
ATPase 8 – Adeniltrifosfatase 8  
BSE – (*bovine spongiform encephalopathy*) Encefalopatia Espongiforme Bovina  
C – Citosina  
CCD – (*charge-coupled device*) Dispositivo de Carga Acoplada  
COII – Subunidade II da Oxidase do Citocromo  
COI – Subunidade I da Oxidase do Citocromo  
Ct – (*threshold cycle*) Ciclo de Threshold  
CTAB – (*cetyl trimethylammonium bromide*) Brometo de Cetil Trimetil Amónio  
cyt b – Citocromo b  
DLB – *Dual Live Buffer*  
DOP – Denominação de Origem Protegida  
dNTP – Desoxinucleótidos Tri-Fosfato  
dsADN – (*double stand DNA*) ADN de Cadeia Dupla  
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético  
ELISA – (*enzyme-linked immunosorbent assay*) Ensaio Imunoenzimático  
ESI – (*electrospray ionization*) Ionização por Eletrospray  
FSA – *Food Standards Agency*  
FTS – (*food traceability system*) Sistema de Rastreabilidade Alimentar  
G – Guanina  
g – grama  
gADN – ADN Genómico  
GTP – (*good traceability practice*) Boa Prática de Rastreabilidade  
Gu-HCL – Hidrocloreto de Guanidina  
GFSI – *Global Food Safety Initiative*  
HCL – Ácido Clorídrico  
HRM – (*high resolution melt*) Análise da temperatura de *Melting* de Elevada Resolução  
IAC – (*internal amplification control*) Controlo Interno de Amplificação  
ISO – *International Standards Organization*  
LC – (*liquid chromatography*) Cromatografia Líquida  
LI – Líquidos Iónicos  
LINE – (*long interspersed nuclear elements*) Elementos Nucleares Longos Dispersos  
LOD - Limite de Detecção  
LUX<sup>TM</sup> – *Light Upon eXtension*  
M – molar  
MALDI - (*matrix-assisted laser desorption ionization*) Ionização e dessorção a laser assistida por matriz  
mg – Miligramas  
mL – Mililitros  
mM – Milimolar  
mtADN – ADN Mitocondrial  
MS – (*mass spectrometry*) Espectrometria de Massa



**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**NaOH** – Hidróxido de Sódio  
**ng** – nanogramas  
**PAGE** – (*polyacrylamide gel electrophoresis*) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida  
**PCR** – (*polymerase chain reaction*) Reação em Cadeia da Polimerase  
**Pb** – Pares de Base  
**PBS** – (*phosphate buffered saline*) Tampão Fosfato Salino  
**PCB** (*polychlorinated biphenyls*) – Bifenilos Policlorados  
**Pg** – Picograma  
**pH** – Potencial de Hidrogénio  
**PPi** – Pirofosfato  
**qPCR** – PCR em Tempo Real  
**RAPD** – (*random amplified polymorphic DNA*) Amplificação Aleatória de ADN Polimórfico  
**RFLP** – (*restriction fragment length polymorphism*) Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição  
**RFU** – (*relative fluorescence unit*) Unidade Relativa de Fluorescência  
**RNase** – Ribonuclease  
**RNase A** – Ribonuclease A  
**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio  
**SINE** – (*short interspersed nuclear elements*) Elementos Nucleares Curtos Dispersos  
**SNP** – (*single nucleotide polymorphism*) Polimorfismo de Nucleótido Único  
**ssADN** – (*single strand DNA*) ADN de cadeia única  
**SSCP** – (*single-strand conformation polymorphism*) Polimorfismos Conformacionais de Cadeia Única  
**SSP** – (*species specific PCR*) PCR específico de espécie  
**T** – Temperatura  
**T** – Timina  
**TE** – Tris-EDTA  
**Tm** – Temperatura de *melting*  
**Tris** – Trisaminometano  
**TRU** – (*traceable resource unit*) Unidade de Recurso Rastreável  
**UE** – União Europeia  
**u.i** – Unidades Internacionais

# Índice

1.	Introdução	1
1.1	- Fraude Alimentar	1
1.2	- Produtos Cárneos	4
1.3	- Rastreabilidade	7
1.4	- Autenticidade em Portugal	10
1.5	- Fraude alimentar a nível europeu e a repercussão na UE	10
1.6	- Métodos de Análise Alimentar	11
1.6.1	- Métodos com base em Proteínas	11
1.6.1.1	- Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	11
1.6.1.2	- Proteómica (Espectrometria de Massa - MS)	13
1.7	- Métodos com base no ADN	14
1.7.1	- O ADN	14
1.7.1.1	- ADN genómico (gADN) e ADN mitocondrial (mtADN)	14
1.7.2	- Extração de ADN	16
1.7.3	- PCR	19
1.7.3.1	- PCR Específico de Espécie (SSP)	20
1.7.3.2	- Polimorfismo Conformacional de Cadeia Única (SSCP-PCR)	21
1.7.3.3	- ADN Polimórfico Aleatoriamente Amplificado (RAPD-PCR)	22
1.7.3.4	- Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP)	23
1.7.3.5	- Sequenciação	24
1.7.3.6	- ADN barcoding	24
1.7.3.7	- PCR em Tempo Real (qPCR)	25
1.7.3.7.1	- qPCR-HRM	26
1.7.3.7.2	- Quantificação	26
1.7.4	- Métodos de Detecção na qPCR	31
1.7.4.1	- Corantes fluorescentes intercalantes (exs: SYBR <sup>®</sup> Green I; Eva Green).	31
1.7.4.2	- Sondas fluorescentes	32
1.7.4.2.1	- Sondas de hidrólise (ex: TaqMan <sup>®</sup> )	32
1.7.4.2.2	- Sondas <i>Hairpin</i> (ex: Molecular Beacons)	33
1.7.4.2.3	- Sondas de hibridação marcadas com fluorescência (ex: FRET)	34
1.7.5	- Marcadores Moleculares na Autenticação de Produtos Cárneos	34
2.	Objetivos	37

3.	Material e Métodos	39
3.1	- Reagentes e Soluções	39
3.1.1	- Preparação das Soluções	39
3.2	- Amostras	41
3.3	- Homogeneização de Tecidos e Extração de ADN	44
3.3.1	- Homogeneização do Tecido Animal	44
3.3.2	- Protocolos de Extração de ADN	44
3.3.2.1	- Extração de ADN pelo método Fenol-Clorofórmio	44
3.3.2.2	- Extração de ADN pelo método de CTAB modificado	44
3.3.2.3	- Extração de ADN através do protocolo “ilustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit”	45
3.3.2.4	- Extração de ADN pelo Método de Wizard modificado	46
3.4	- Quantificação e Análise da Pureza do ADN extraído	46
3.4.1	- Quantificação por Fluorimetria (Qubit™)	47
3.4.2	- Quantificação e avaliação da pureza do ADN (Nanodrop™ 1000)	47
3.5	- Amplificação de ADN	48
3.5.1	- Amplificação das amostras com o kit de amplificação <i>Taq PCR Core kit (Qiagen)</i> .	48
3.5.2	- <i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i> (Bio-Rad)	49
3.5.3	- <i>VERYFinder Swine Semi-Q Assay</i> (Generon)	51
3.5.4	- <i>VERYFinder Equine Semi-Q Assay</i> (Generon)	51
3.5.5	- <i>AllHorse</i> (Microsynth)	52
3.6	- Eletroforese em gel de agarose (2%)	53
4.	Resultados e Discussão	55
4.1	- Avaliação do ADN extraído das amostras de carne fresca	55
4.1.1	- Análise da concentração e pureza do ADN extraído das amostras de carne frescas	55
4.1.2	- Avaliação da integridade do ADN extraído das amostras de carne fresca	59
4.1.3	- Avaliação da viabilidade do ADN, obtido pelos diferentes protocolos de extração, para amplificação por PCR convencional com o <i>kit</i> de amplificação <i>Core kit</i> e os <i>primers</i> 18S rARN	60
4.2	- Determinação da sensibilidade e especificidade do sistema de amplificação composto pelo <i>kit</i> de amplificação <i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i> e os <i>primers Pork</i> , específicos de <i>Sus scrofa</i>	61
4.3	- Determinação da sensibilidade do sistema de amplificação específico de <i>Sus scrofa</i> integrante do <i>kit Tetraplex AllHorse</i>	64

4.4	- Determinação da especificidade dos sistemas de amplificação integrantes do <i>kit Tetraplex AllHorse</i> e avaliação da <i>performance</i> da qPCR para amplificação do ADN obtido pelos diferentes métodos de extração	66
4.5	- Avaliação do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais	69
4.5.1	- Análise da concentração e pureza do ADN extraído de 4 amostras de hambúrgueres comerciais	69
4.5.2	- Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais, com o <i>kit</i> de amplificação <i>SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix</i> e os <i>primers</i> específicos para <i>Sus scrofa</i>	70
4.5.3	- Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais com o <i>kit AllHorse</i>	71
4.5.4	- Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais com o <i>kit Veryfinder Equine Semi-Q Detection Assay</i>	72
4.5.5	- Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais teste, com o <i>kit Veryfinder Swine Semi-Q Detection Assay</i>	73
5.	Conclusões	75
6.	Bibliografia	79
	Anexos	87
	Anexo I - Visão geral das vantagens e desvantagens na determinação de espécies, baseado na PCR qualitativa e quantitativa. Adaptado de Ballin <i>et al.</i> , (2009).	89
	Anexo II - Vantagens e desvantagens de diversos genes alvo. Adaptado de Mohamad <i>et al.</i> (2013).	91
	Anexo III – Declaração comprovativa da autenticidade das amostras de carne analisadas e identificadas por etiquetas (Anexo IV).	93
	Anexo IV – Etiquetas de identificação de autenticação dos animais de origem das amostras de carne de talho analisadas.	95

## Índice de Figuras

Figura 1 - Convergência, temporal e espacial, de três condições necessárias à ocorrência de diferentes formas de crime alimentar: Potencial Adúltero; Potencial Alvo (Rede de Abastecimento Alimentar); Ausência de Métodos de Proteção (Tecnologias de Detecção). Adaptado de Ellis <i>et al.</i> (2015).	3
Figura 2 - Representação conceptual da rastreabilidade aplicada à cadeia de abastecimento alimentar. Adaptado de Bosona <i>et al.</i> (2013).	8
Figura 3 - Componentes da The TraceFood Framework. Adaptado de StorØy <i>et al.</i> (2013).	9
Figura 4 - Métodos ELISA, Direto e <i>Sandwich</i> . O antígeno de interesse é imobilizado por adsorção direta à placa de ensaio ou pela ligação a um anticorpo de captura à superfície da placa. A detecção do antígeno ocorre utilizando um anticorpo primário/secundário conjugado. Adaptado de Overview of ELISA (ThermoFisherScientific).	12
Figura 5 - Identificação Proteica por Espetrometria de Massa. Adaptado de Serang & Noble (2012).	13
Figura 6 - Rutura da membrana celular, solubilização lipídica e extração do ADN. Adaptado de Somma (2006).	18
Figura 7 - Esquema da extração com tampão iónico líquido para ADN de carne. Adaptado de Ressman <i>et al.</i> (2015).	19
Figura 8 - Ciclo da PCR. Adaptado de Kashani <i>et al.</i> (2014).	20
Figura 9 - Princípio da PCR-SSCP. Adaptado de Gasser <i>et al.</i> (2003).	22
Figura 10 - Princípio da Técnica de PCR-RAPD. Adaptado de Arif <i>et al.</i> (2010).	22
Figura 11 - Fases da PCR. Adaptado de Real-Time PCR Vs Tradicional PCR. Applied Biosystems.	27
Figura 12 - Princípio da detecção de fluorescência em tempo real e medição da concentração dos alvos da qPCR através do Ct (Ciclo de Threshold). Adaptado de “Introduction to Quantitative PCR. Methods and Applications Guide.” Agilent Technologies. (2012).	27
Figura 13 - Construção da curva <i>standard</i> através da amplificação de diluições em série de concentrações de ADN conhecidas: i) diluições em série; ii) curvas de amplificação da qPCR; iii) curva <i>standard</i> . Adaptado de University of Northern British Columbia, “Gene Expression”.	28
Figura 14 - Curva Standard da PCR em Tempo Real. Adaptado de Iotti <i>et al.</i> (2012).	30
Figura 15 - Mecanismo de ação do marcador intercalante SYBR® Green I. Adaptado de A Technical Guide to PCR Technologies. SigmaAldrich®.	31
Figura 16 - Mecanismo da ação da sonda TaqMan®. Adaptado de “Introduction to Quantitative PCR. Methods and Applications Guide”. Agilent Technologies (2012).	33
Figura 17 - Mecanismo de ação das sondas Molecular Beacons. Adaptado de A Technical Guide to PCR Technologies. Sigma Aldrich®.	33
Figura 18 - Mecanismo de acção das sondas FRET. Adaptado de Dual-Labeled Probes. How Dual-Labeled Probes Work Sigma-Aldrich®.	34
Figura 19 - Número de inquiridos que consome comida à base de carne processada.	42
Figura 20 – Principais produtos à base de carne processada adquiridos.	42

Figura 21 - Principais marcas de produtos processados adquiridas.	43
Figura 22 - Principais superfícies comerciais de aquisição de produtos processados.	43
Figura 23 - Gráfico comparativo do rendimento das extrações pelos diferentes métodos.	58
Figura 24 - Gráfico comparativo da pureza do ADN ( $A_{260}/A_{280}$ ) extraído pelos diferentes métodos de extração.	58
Figura 25 - Gráfico comparativo da pureza do ADN ( $A_{260}/A_{230}$ ) extraído pelos diferentes métodos de extração.	59
Figura 26 - Comparação da fragmentação do ADN extraído pelos métodos de CTAB, Fenol-Clorofórmio e Wizard: M (marcador molecular 100pb); V (amostras <i>Bos taurus</i> ); P (amostras <i>Sus scrofa</i> ); C (amostras <i>Equus caballus</i> ); O (amostras <i>Ovis aries</i> ).	59
Figura 27 - Avaliação da viabilidade do ADN extraído pelos métodos de CTAB, Fenol-Clorofórmio e Wizard para amplificação por PCR: M (marcador molecular 50pb); V (amostras <i>Bos taurus</i> ); P (amostras <i>Sus scrofa</i> ); C (amostras <i>Equus caballus</i> ); O (amostras <i>Ovis aries</i> ).	60
Figura 28 - Curva de amplificação da diluição seriada do extrato de porco, amplificada por PCR em tempo real com <i>SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix</i> , usando os <i>primers</i> Pork-F/Pork-R específicos para a porco.	61
Figura 29 - Curva de calibração da diluição seriada do extracto de porco, amplificada por PCR em Tempo Real com <i>SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix</i> , usando os <i>primers</i> Pork-F/Pork-R, específicos para a porco.	62
Figura 30 - Curva e picos de <i>melting</i> da diluição seriada do extrato de porco, amplificada por PCR em tempo real com <i>SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix</i> , usando os <i>primers</i> Pork-F/Pork-R, específicos para a porco.	63
Figura 31 - Amplificação das amostras de <i>Bos taurus</i> , <i>Equus caballus</i> e <i>Ovis aries</i> , com o kit <i>Sso<sup>TM</sup> Fast EvaGreen<sup>®</sup></i> e os <i>primers</i> <i>Pork</i> , na diluição de 2 ng/ $\mu$ L e de um controlo positivo da espécie <i>Sus Scrofa</i> . Somente o controlo positivo amplificou.	64
Figura 32 - Curvas de amplificação da diluição seriada do extracto de porco, amplificada por PCR em Tempo Real com o kit <i>tetraplex AllHorse</i> com <i>primers</i> e sondas específicos para <i>Sus scrofa</i> (porco), <i>Bos taurus</i> (vaca), <i>Equus caballus</i> (cavalo) e <i>Ovis aries</i> (ovelha).	65
Figura 33 - Curva de calibração da diluição seriada do extracto de porco, amplificada por PCR em tempo real com o kit <i>tetraplex Allorse</i> , com <i>primers</i> e sondas específicas para <i>Sus scrofa</i> (porco), <i>Bos taurus</i> (vaca), <i>Equus caballus</i> (cavalo) e <i>Ovis aries</i> (ovelha).	66
Figura 34 - Amplificação com o kit <i>AllHorse</i> , do ADN extraído da amostra de vaca ( <i>Bos taurus</i> ) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).	67
Figura 35 - Amplificação com o kit <i>AllHorse</i> do ADN extraído da amostra de porco ( <i>Sus scrofa</i> ) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).	67
Figura 36 - Amplificação com o kit <i>AllHorse</i> do ADN extraído da amostra de cavalo ( <i>Equus caballus</i> ) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).	68
Figura 37 - Amplificação com o kit <i>AllHorse</i> do ADN extraído da amostra de ovelha ( <i>Ovis aries</i> ) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).	68

- Figura 38 - Amplificação das amostras dos hambúrgueres comerciais com o sistema de amplificação *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* com os primers específicos para *Sus scrofa* (porco). 71
- Figura 39 - Amplificação, com o *Kit AllHorse*, do ADN extraído das amostras teste (Tabela 8), juntamente com os controlos positivos para cada espécie. *Bos taurus* (vermelho); *Sus scrofa* (verde); *Equus caballus* (azul); *Ovis aries* (roxo). 71
- Figura 40 - Amplificação das amostras de hambúrgueres comerciais com o *Kit Veryfinder Equine Semi-Q Assay*: ADN Equino (azul); IAC (verde). 73
- Figura 41 - Amplificação das amostras de hambúrgueres comerciais com o *Kit Veryfinder Swine Semi-Q Assay*: ADN suíno (azul); IAC (verde). 74

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Definições de termos importantes na temática da Fraude Alimentar. Adaptado de Ellis <i>et al.</i> (2015).	1
Tabela 2 - Tabela resumo de recentes eventos de fraude alimentar. Adaptado de Ellis <i>et al.</i> (2015).	2
Tabela 3 - Inibidores da Reação de PCR. Adaptado de Somma, 2006.	16
Tabela 4 - Diferentes Métodos de Extração aplicados em amostras de carne.	17
Tabela 5 - Identificação das amostras controlo das espécies utilizadas neste trabalho.	41
Tabela 6 - Descrição das amostras comerciais testadas.	41
Tabela 7 - Componentes constituintes da reação de amplificação com <i>Taq PCR Core Kit</i> .	49
Tabela 8 - Condições de amplificação para o <i>kit Taq PCR Core Kit</i> .	49
Tabela 9 - Componentes constituintes da reação de PCR com <i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i> .	50
Tabela 10 - Condições de amplificação para o <i>SsoFast EvaGreen® Supermix</i> .	50
Tabela 11 - <i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Sus scrofa</i> (porco) e como controlo da amplificação (18S rRNA).	50
Tabela 12 - Protocolo de Amplificação do <i>kit Veryfinder Swine Semi-Q Assay</i> (Generon)	51
Tabela 13 - Protocolo de Amplificação do <i>Kit Veryfinder Equine Semi-Q Assay</i>	52
Tabela 14 - Descrição dos <i>primers</i> e sondas constituintes do <i>Kit AllHorse</i> . Adaptado de Koppel <i>et al.</i> (2011).	53
Tabela 15 - Análise do ADN extraído das amostras pelo método Fenol-Clorofórmio.	56
Tabela 16 - Análise do ADN extraído das amostras controlo pelo método de CTAB.	56
Tabela 17 - Análise do ADN extraído das amostras controlo pelo método de Wizard.	57
Tabela 18 - Análise do ADN extraído das amostras controlo pelo protocolo <i>illustra</i> .	57
Tabela 19 - Resultados obtidos para a determinação do LOD absoluto por PCR em tempo real de ADN de porco ( $C_t$ – média do número de ciclos; $SD^2$ – desvio padrão).	62
Tabela 20 – Misturas <i>standard</i> preparadas a partir das diluições em série semi-logarítmicas para o <i>kit AllHorse</i> contendo desde 32 a 0,1 ng de ADN de amostra das diferentes espécies, por 5 $\mu$ L de volume de reação. Adaptado de Koppel <i>et al.</i> (2011).	65
Tabela 21 – Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais.	70
Tabela 22 - Regras para análise dos resultados de amplificação. Adaptado de <i>Veryfinder Equine Semi-Q</i> .	72
Tabela 23 - Regras para análise dos resultados de amplificação. Adaptado de <i>Veryfinder Swine Semi-Q Assay</i> .	73



# 1. Introdução

## 1.1 - Fraude Alimentar

Eventos episódicos de adulteração e contaminação alimentar têm ocorrido com uma regularidade inquietante (Ellis *et al.*, 2015; Lotta & Bogue, 2015).

Ainda que este seja um assunto com uma amplitude cada vez maior, não se encontra até então estabelecida uma definição concreta, em termos de legislação, do que é a fraude alimentar (Lotta & Bogue, 2015).

No entanto, existem múltiplos termos que se devem reter no que concerne esta matéria (Tabela 1).

**Tabela 1** - Definições de termos importantes na temática da Fraude Alimentar. Adaptado de Ellis *et al.* (2015).

<b>Termo</b>	<b>Definição</b>
<b>Fraude</b>	O alimento é deliberadamente colocado no mercado, com intenção de enganar o consumidor, para ganhos financeiros. Inclui: comércio de alimentos impróprios para consumo e rotulagem indevida.
<b>Contaminação</b>	Contaminação física, química ou biológica, normalmente, não intencional. Se provado em contrário, é considerada crime e, consoante a sua intenção e extensão, bioterrorismo.
<b>Deterioração</b>	Qualquer alteração (descoloração, odor, sabor) nas características organoléticas, que tornam um alimento indesejável para consumo.
<b>Crime</b>	Quando a fraude se torna uma atividade organizada, levada a cabo por grupos estabelecidos, com o intuito de enganar o consumidor.
<b>Segurança</b>	Assegurar o acesso a uma porção suficiente e segura de alimentos nutritivos para manter um estilo de vida saudável.
<b>Autenticidade</b>	Rotulagem correta de um produto alimentar final.
<b>Integridade</b>	Assegurar que os produtos alimentares comercializados detêm a qualidade e natureza esperada pelo consumidor.

Segundo Ellis *et al.* (2015) a mais recente fase da globalização (finais do século 20) é apontada como a impulsionadora dos consumidores, produtores e órgãos reguladores à tomada de consciência destes fenómenos. A própria UE reconhece que o combate à fraude alimentar é uma preocupação relativamente recente, nunca tendo sido colocada como uma prioridade em termos legislativos, no passado (Lotta & Bogue, 2015).

A procura por uma ampla gama de produtos alimentares, independentemente da sazonalidade ou disponibilidade, resultou no crescimento e, por conseguinte, no aumento da complexidade das redes de abastecimento alimentar (Ellis *et al.*, 2015; Lotta & Bogue, 2015). Isto resulta numa maior vulnerabilidade das mesmas a possíveis situações de fraude e contaminação alimentar (Ellis *et al.*, 2015; Lotta & Bogue, 2015).

Segundo a *Global Food Safety Initiative*, a complexidade inerente a toda a cadeia alimentar leva a que todos os anos o setor admita um prejuízo de 30 a 40 mil milhões de dólares (Rey Y., 2014).

São vários os exemplos de precaridade na segurança alimentar que, nas últimas décadas, tiveram um impacto considerável na população (Tabela 2).

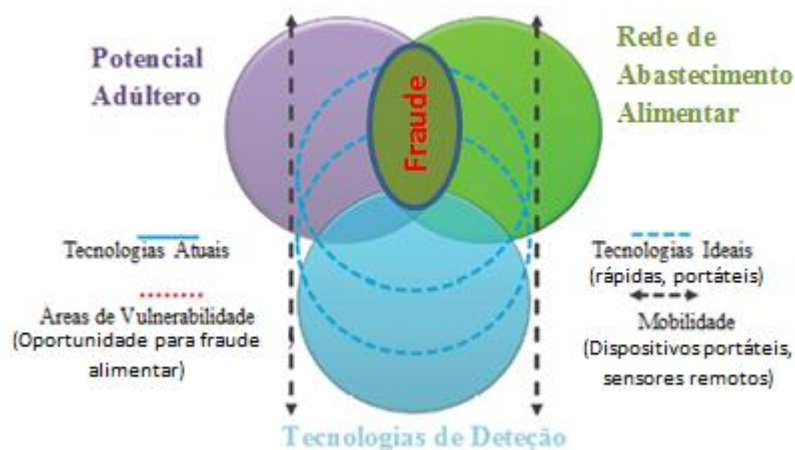
**Tabela 2** - Tabela resumo de recentes eventos de fraude alimentar. Adaptado de Ellis *et al.* (2015).

Evento	Local	Data
Síndrome da Colza (Óleo Tóxico)	Espanha	1981
Dietilenoglicol no vinho	Áustria	1985
Adulteração do vinho (ex: com metanol)	Itália	1986
Alimentos de gado infetados com <i>scrapie</i> conduzem à BSE	Reino Unido	1980 a 1990
Corantes Sudan I-IV cancerígenos detetados em <i>chilli</i> em pó e produtos à base de tomate	-	2003
PCB e dioxinas presentes na carne de porco resultante da contaminação de alimentação animal com óleo de industrial	Bélgica	1999
	Irlanda	2008
Adulteração de produtos lácteos com melamina	China	2008
Escândalo da carne de cavalo	Reino Unido/Europa	2013

Destacando o marcante escândalo da carne de cavalo no início de 2013, a revista britânica *Which?* avaliou o impacto imediato que este provocou na confiança dos consumidores face à indústria alimentar. Num estudo realizado entre os dias 22 e 24 do mês de fevereiro de 2013, a 2064 cidadãos adultos, foi possível apurar que a confiança na indústria alimentar reduziu em cerca de 24%. Dos inquiridos, 30% admitiram ter reduzido a aquisição de carne processada e 24% limitou a compra de comidas prontas contendo carne ou adquiriu comidas vegetarianas em detrimento destas. Ainda que 44% dos inquiridos tenham admitido estar mais atentos aos rótulos dos produtos alimentares, metade (50%) reconheceu não confiar nas informações constantes dos mesmos. Outra evidência relevante apurado foi o facto de 83% dos inquiridos concordar que a rotulagem referente ao país de origem deva ser exigida em produtos de carne (Which?, 2013).

Cada vez mais, a oportunidade para cometer fraude alimentar, incluindo adulteração e rotulagem inadequada, é maior, graças à veloz expansão de vários sectores alimentares, tornando esta situação um problema à escala mundial (Ellis *et al.*, 2015; Lotta & Bogue, 2015).

Três condições fundamentais são necessárias à ocorrência de fraude alimentar (Figura 1).



**Figura 1** - Convergência, temporal e espacial, de três condições necessárias à ocorrência de diferentes formas de crime alimentar: Potencial Adúltero; Potencial Alvo (Rede de Abastecimento Alimentar); Ausência de Métodos de Proteção (Tecnologias de Detecção). Adaptado de Ellis *et al.* (2015).

Os consumidores acreditam na veracidade dos rótulos alimentares como base de uma escolha informada aquando da aquisição de um produto (Kane *et al.*, 2015). A rotulagem é, assim, de extrema importância, principalmente se não for possível identificar visualmente as espécies constituintes dos produtos alimentares (Ulca *et al.*, 2013). Ainda que esta deva ser precisa e honesta, principalmente quando consideramos comida processada (Primrose *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010), por si só a rotulagem não é sinónimo de garantia (Ballin *et al.*, 2012; Cammá *et al.*, 2012).

Na União Europeia, a informação que deve constar nos rótulos dos produtos alimentares encontra-se estabelecida por lei (Diretiva 2002/86/CE – os produtos cárneos devem conter nos rótulos a indicação e quantidade de cada espécie utilizada) (Primrose *et al.*, 2010). Mais se acrescenta, que segundo a legislação da Comissão Europeia (178/2002), acerca da segurança alimentar, todas as partes interessadas que compõem a cadeia de abastecimento alimentar devem poder rastrear na íntegra a matéria-prima dos produtos alimentares fabricados (Ali *et al.*, 2012; Lotta & Bogue, 2015).

Agências, como a instituição governamental FSA (Food Standards Agency) no Reino Unido, nasceram com o objetivo de verificar se esta legislação é cumprida na prática e, assim, expor casos ilícitos (Primrose *et al.*, 2010). Recentemente, esta questão chamou também à atenção de

organizações de ação global, como a ISO e GFSI, que definiram regras para o restabelecimento da segurança nas redes alimentares desde a raiz, por forma a assegurar os consumidores (Lotta & Bogue, 2015).

Assim, o conhecimento da composição dos produtos alimentares (Safdar *et al.*, 2014), a verificação da conformidade da rotulagem com a legislação e a subsequente deteção de fraudes (Primrose *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2014) surgem como questões ímpares para a salvaguarda dos consumidores e produtores, das substituições indesejadas e ilegais (Rojas *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Kashani *et al.*, 2014; Safdar *et al.*, 2014), proteção do valor de produtos locais (Rogberg-Muñoz *et al.*, 2014) e minimização de perdas económicas (Kashani *et al.*, 2014), proteção dos animais (Bottero *et al.*, 2011) e ainda da indústria da restauração (Yang *et al.*, 2014).

Dentre os produtos alimentares comercializados, os produtos lácteos, a carne, os frutos do mar, o vinho, bebidas espirituosas, óleos alimentares, mel, sumos de frutas, café e chá, produtos orgânicos e processados e, ainda, produtos *Halal* são os alvos mais comuns no que toca à fraude alimentar (Ellis *et al.*, 2015). Entenda-se produtos alimentares *Halal* como sendo todos os produtos permitidos ao consumo pela população muçulmana e que devem respeitar uma série de critérios como a ausência de carne de porco, sangue animal e carne de animais que não sejam sacrificados em nome de *Allah* (Muhktar *et al.*, 2012).

A fraude alimentar ocorre de forma permanente ainda que os alvos da mesma variem constantemente. As últimas referências apontam para a ocorrência de adulteração de várias ervas e especiarias, no continente asiático – “*Escândalo do Óleo de Sarjeta*” - e do arroz falsificado, que poderão resultar em potenciais problema futuros (Ellis *et al.*, 2015).

## **1.2 - Produtos Cárneos**

A carne é considerada uma fonte proteica primordial, sendo consumida na maior parte dos países desenvolvidos ocidentais (Soares *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2014).

Recentes avanços na identificação dos nutrientes essenciais ao Homem, como proteínas de elevada qualidade, providenciam razões válidas para enfatizar a importância que alimentos ricos, como as carnes vermelhas magras, têm numa dieta saudável (Binnie *et al.*, 2014).

As proteínas animais, em especial derivadas de carne de alta qualidade, podem, por isso, alcançar preços de mercado consideráveis (Rojas *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2014).

Dada a elevada procura e valor económico associado, a sua adulteração tornou-se um problema abrangente nos últimos anos, nomeadamente no que respeita a produtos processados (Kashani *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), propensos à substituição fraudulenta (Rahman *et al.*, 2014).

A título de exemplo, apesar de a utilização de proteínas vegetais (derivadas, por exemplo, de rebentos de soja) ser uma prática frequente na indústria da carne, quando estas não constam no rótulo do produto, a sua adição é considerada uma prática falaciosa, aplicada com o intuito de reduzir os custos de produção (Soares *et al.*, 2014; Safdar *et al.*, 2014). O mesmo se verifica com as carnes de frango e peru (Cammá *et al.*, 2012), porco e cavalo utilizadas em substituição das carnes vermelhas (Safdar *et al.*, 2014), em particular a carne de vitela (Ali *et al.*, 2012; Kashani *et al.*, 2014), em salsichas e charcutaria (Cammá *et al.*, 2012), resultando num ganho económico acrescido (Ali *et al.*, 2012).

Num estudo publicado por Meira *et al.* (2014) 67 amostras comerciais contendo carne de vaca nos rótulos foram analisadas para a presença de ADN equino. 33 das amostras foram recolhidas previamente ao escândalo (2012) e 34 amostras foram recolhidas, entre 2013 e 2014, posteriormente ao escândalo. Somente duas amostras de carne processada, um hambúrguer e uma salsicha, revelaram a presença de ADN equino. No entanto, as quantidades detetadas foram consideradas contaminações, dado que em ambas as amostras eram inferiores ao limite de deteção absoluto obtido no estudo (0,1 pg) (Meira *et al.*, 2014).

Em Portugal a produção de alheiras com carne de animais de caça (Alheira de Caça), como veado, coelho selvagem e lebre, tem vindo a aumentar (Amaral *et al.*, 2014). Esta carne, caracterizada pelo seu sabor intenso e composição saudável, surge no mercado com preços mais elevados (Fajardo *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2014). Vários foram os casos apontados por Amaral *et al.* (2014) em que este produto foi alvo de fraude. Dentre 18 amostras de alheira de caça analisadas, em que 13 declaravam especificamente as espécies constituintes das mesmas, 11 não respeitavam a rotulagem, por ausência, adição ou substituição de uma ou várias espécies indicadas (Amaral *et al.*, 2014).

Outra questão que levanta cada vez mais inquietação são os produtos alimentares com designação *Halal* (Koppel *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2015). As populações, muçulmana e judaica, em conformidade com as suas crenças religiosas, abstêm-se do consumo de carne de porco e cavalo, mesmo em quantidades reduzidas (Mohamad *et al.*, 2013; Safdar *et al.*, 2014). As carnes *Halal* exigem, assim, o seguimento de determinadas normas de produção, que se refletem em preços de mercado mais elevados, essencialmente nos países onde a população muçulmana é uma minoria (Rahman *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2015). Por estas razões, e de forma a sobreviver à competitividade do mercado (Ali *et al.*, 2011) estes produtos tornam-se também alvos fáceis de fraude alimentar (Ali *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2014).

Num estudo realizado por Amaral *et al.* (2015), 15 produtos com designação *Halal* e 26 produtos não-*Halal* rotulados como sendo constituídos somente por carne de aves, foram analisados quanto à presença de ADN suíno. Verificou-se a existência de ADN de carne de porco em 6 dos 15 produtos

*Halal* e 16 dos produtos à base de carne de aves. A quantificação só foi possível de executar em 8 amostras, as quais apresentavam quantidades de ADN suíno acima do limite de deteção (0,01 pg). Ainda que as quantidades de ADN detetado nas amostras de produtos cárneos à base de aves (0,03% - 0,24%) fossem superiores à dos produtos *Halal* (0,01%), todas as amostras analisadas sugerem que esta presença de ADN suíno foi fruto de possíveis contaminações aquando da sua produção (Amaral *et al.*, 2015).

Isto prova que os rótulos incorretos podem ser resultado de fraca rastreabilidade, fraude intencional mas também contaminação cruzada (Kane *et al.*, 2015). Assim sendo, 1% tem sido o valor estabelecido para consideração de contaminação acidental, à semelhança da presença de OGM em produtos alimentares (Sol *et al.*, 2015).

Os inúmeros casos de adulteração de carne, expostos pelos media nos últimos anos, têm intensificado a preocupação dos consumidores e dos organismos reguladores (Ballin *et al.*, 2012; Cammá *et al.*, 2014) relativamente à composição dos alimentos (Soares *et al.*, 2014).

Várias são as razões apontadas que evidenciam a ilegitimidade destas práticas:

- económicas, praticadas com o intuito de fazer face à competição (Primrose *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2014);
- legais (Amaral *et al.*, 2014);
- religiosas, sendo o consumo de algumas espécies censurado por certas religiões (Dooley *et al.*, 2004; Ballin *et al.*, 2009; Primrose *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2014; Kane *et al.*, 2015);
- éticas, quando consideramos estilos de vida como o vegetarianismo (Primrose *et al.*, 2010; Dooley *et al.*, 2004; Ballin *et al.*, 2009; Primrose *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013);
- de saúde pública (Dooley *et al.*, 2004; Ballin *et al.*, 2009; Primrose *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2014; Kane *et al.*, 2015);
- proteção de espécies, principalmente as que se encontram em vias de extinção, da sua comercialização (Fajardo *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2012).
- surtos de epidemias em populações de gado - encefalopatia espongiforme bovina; gripe das aves; brucelose (Fajardo *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011; Rogberg-Muñoz *et al.*, 2014);
- contaminações químicas de produtos alimentares - crise da dioxina (Bottero *et al.*, 2011; Rogberg-Muñoz *et al.*, 2014).

A avaliação da autenticidade de produtos cárneos engloba diversas situações:

- substituição de espécies de elevado valor comercial por espécies economicamente acessíveis (Primrose *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014);

- presença não declarada de outras espécies (Primrose *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2014);
- substituição de carne por proteínas vegetais (Amaral *et al.*, 2014);
- rotulagem fraudulenta (Primrose *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014; Kane *et al.*, 2015);
- indicações falsas acerca da origem geográfica ou de produção (Primrose *et al.*, 2010).

Os pontos anteriormente indicados conduziram ao aumento da procura pela segurança alimentar (Bottero *et al.*, 2011; Rogberg-Muñoz *et al.*, 2014), a qual se tornou uma prioridade política fundamental para a União Europeia (Cammá *et al.*, 2012).

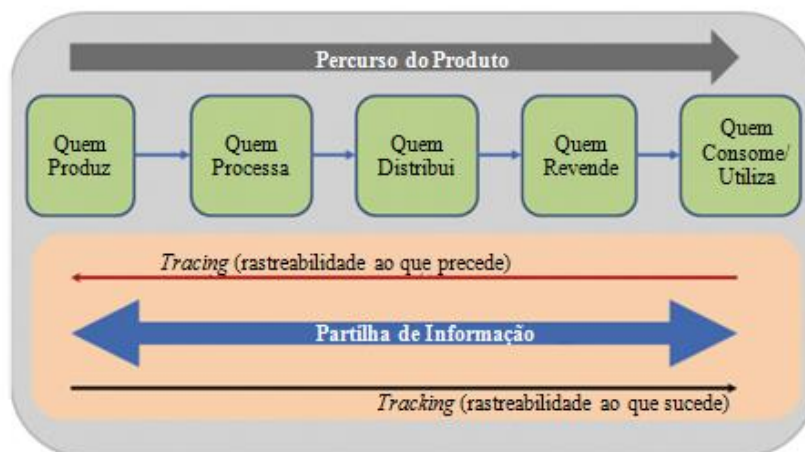
### 1.3 - Rastreabilidade

A rastreabilidade é um componente importante, em particular, nas cadeias de distribuição alimentar, dada a influência que apresentam na saúde do Homem e animais (Bosona *et al.*, 2013). A importância deste conceito tem vindo a aumentar devido às recorrentes falhas no sistema de segurança alimentar e à consequente exigência cada vez maior dos consumidores no que respeita à qualidade dos produtos alimentares (Storøy *et al.*, 2013).

De acordo com a União Europeia e a ISO 8402, a rastreabilidade é descrita de forma genérica como a capacidade de localizar qualquer alimento, substância ou animal criado para alimentação, com a finalidade de ser consumido, em todo o ponto da cadeia de produção, processamento e distribuição (Storøy *et al.*, 2013; Bosona *et al.*, 2013). Ou seja, cada empresa integrante de uma cadeia alimentar deve conhecer os seus fornecedores (*tracing* – identificar a origem de produtos) e clientes (*tracking* – seguir o caminho de uma unidade produzida) diretos, de forma que em caso de situação irregular, a sua causa possa ser facilmente identificada (Storøy *et al.*, 2013; Bosona *et al.*, 2013). Contudo, Dabbene & Gay (2011) e Bosona *et al.* (2013) dão ênfase a um terceiro fator essencial que completa esta definição: a gestão logística de qualquer fluxo de informação que acompanha o percurso do produto alimentar (Figura 2).

A detenção desta informação por parte dos integrantes de uma cadeia alimentar permite ainda que esta possa ser fornecida de forma imediata quando requisitada por autoridades de inspeção (Storøy *et al.*, 2013).

A juntar aos factores preponderantes de saúde pública e crise económica, outros pontos revelam a necessidade e interesse do desenvolvimento de Sistemas de Rastreabilidade Alimentar (FTS), como o estabelecimento de redes de distribuição de menor custo, redução das despesas inerentes à remoção de produtos irregulares do mercado, e expansão das vendas de produtos com composição de difícil distinção (Storøy *et al.*, 2013; Bosona *et al.*, 2013).



**Figura 2** - Representação conceptual da rastreabilidade aplicada à cadeia de abastecimento alimentar. Adaptado de Bosona *et al.* (2013).

Segundo Bosona *et al.* (2013) existem 5 preocupações/forças impulsionadoras para a implementação de FTSs:

1. Segurança e Qualidade – crises relacionadas com a segurança alimentar;
2. Legislativa – estabelecimento de nova legislação;
3. Social – aumento da confiança dos consumidores;
4. Económica – apesar do grande investimento inicial, melhor acesso ao mercado, melhores preços de produto e financiamento do governo são apontados como incentivos para o estabelecimento de FTSs;
5. Tecnológica – novos dispositivos de rastreabilidade nano-tecnológicos estão a ser desenvolvidos, para fazer face aos engenhos complexos e de elevado custo até então utilizados.

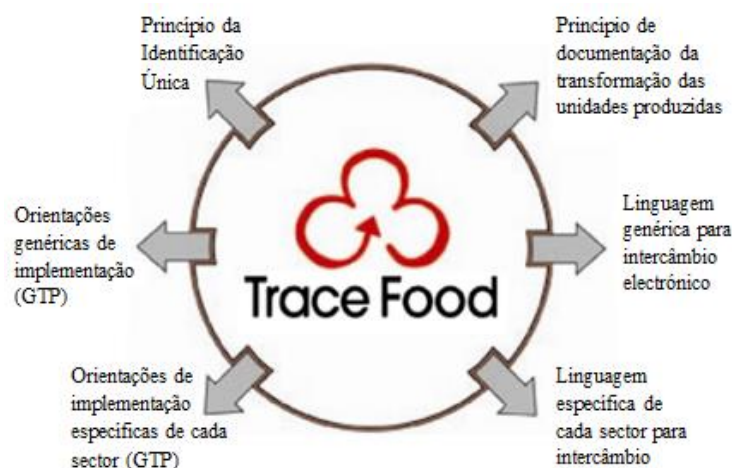
Quanto à implementação de um Sistema de Rastreabilidade Storøy *et al.* (2013), destacam-se três fatores essenciais:

- Identificação única de unidades rastreáveis – necessidade de criar uma unidade de rastreabilidade única (TRU);
- Transformação documentada – registo de qualquer alteração a que um produto seja submetido;
- Troca *standardizada* de informação – os *standards* definidos devem descrever como a informação deve ser formulada, enviada e recebida e como cada elemento informativo deve ser identificado, interpretado e armazenado.

A *The TraceFood Framework* resulta de uma colaboração entre diferentes projetos financiados pela UE relacionados com a rastreabilidade alimentar e cuja estratégia assenta nos parâmetros



identificados na figura 3. Esta já serviu de alicerce a vários estudos piloto direccionados aos sectores do peixe e marisco, água mineral, mel e criação de frangos (Storøy *et al.*, 2013).



**Figura 3** - Componentes da The TraceFood Framework. Adaptado de Storøy *et al.* (2013).

No entanto, verificou-se que o custo associado à sua implementação e a existência de parceiros industriais da mesma cadeia alimentar que não aderiram ao sistema, conduziram ao aumento da complexidade e à descrença por parte da indústria relativamente ao mesmo sistema (Storøy *et al.*, 2013). Além disso, as empresas temem pela possível falta de segurança a que informação desta natureza possa estar exposta (Storøy *et al.*, 2013).

Um estudo levado a cabo por Kher *et al.* (2010), em que 38 profissionais na área da gestão de risco alimentar foram inquiridos acerca da implementação de FTSs, mostrou que todos concordaram que as vantagens prevalecem sobre as desvantagens, anteriormente referidas, sendo os principais benefícios resultantes dos sistemas de rastreabilidade apontados o aumento da satisfação por parte dos consumidores, uma melhor abordagem às situações de crise alimentar, melhoramento na gestão da cadeia de distribuição alimentar e aumento da contribuição científica e tecnológica para a mesma, o desenvolvimento de novas competências e maior assistência à sustentabilidade agroalimentar (Bosona *et al.*, 2013).

Segundo Opara (2003) existem seis elementos de rastreabilidade alimentar:

- Rastreabilidade de produto – localização física do produto em qualquer fase da cadeia de distribuição alimentar;
- Rastreabilidade de processo – tipo e sequência de processos a que o produto é sujeito;
- Rastreabilidade genética – constituição genética do produto;
- Rastreabilidade de aditivos – tipo e origem de aditivos como fertilizantes e conservantes;

- Rastreabilidade de doenças e pragas – epidemiologia de possíveis pragas e patógenos que possam contaminar o produto;
- Rastreabilidade metrológica – qualidade de uma medida relativamente a valores de referência.

No entanto, a aplicação de um sistema de rastreabilidade que abranja a completa cadeia de distribuição alimentar apresenta maior benefício que um elemento de rastreabilidade em particular (Bosona *et al.*, 2013).

Apesar da importância atribuída aos Sistemas de Rastreabilidades Alimentar, a sua implementação é extremamente complexa uma vez que envolve questões não só económicas e legais mas também sociais e depende bastante do desenvolvimento tecnológico (Bosona *et al.*, 2013). Novos métodos e critérios têm vindo a ser introduzidos e otimizados nos últimos anos, com o objetivo de não só melhorar a performance das análises de rastreio alimentar mas também reduzir os custos tecnológicos associados (Dabbene & Gay, 2011).

#### **1.4 - Autenticidade em Portugal**

Em Portugal, a entidade responsável pela segurança alimentar é a ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica) e, como tal, é a esta que compete detetar e coibir este tipo de casos. Em 2013, a ASAE apreendeu 12 mil embalagens de lasanha de carne bovina, produzida no Luxemburgo e comercializada nas lojas Recheio Cash & Carry, por conterem vestígios de carne de cavalo (Sol *et al.*, 2015).

Desde 2014, a ASAE em parceria com a empresa Biopremier, dedica-se à avaliação da autenticidade alimentar, tendo sido estabelecidas ordens para a deteção e quantificação de diversas espécies, entre as quais porco, vaca, cavalo, peru e ovelha (Sol *et al.*, 2015).

Estas atividades, inseridas no Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA), consistiram na análise de um total de 153 amostras de produtos alimentares, entre outubro de 2014 e maio de 2015, dos quais 5 não apresentavam composição concordante com o descrito no rótulo (Sol *et al.*, 2015).

#### **1.5 - Fraude alimentar a nível europeu e a repercussão na UE**

A indústria agroalimentar é o segundo maior sector industrial na União Europeia, pelo que os danos acarretados na sua reputação, as indemnizações atribuídas aos consumidores e a consequente perda

de vendas devido à falta de confiança dos mesmos na qualidade e segurança dos alimentos, resultam numa crise comercial e económica intensa (Lotta & Bogue, 2015).

A obrigação da manutenção da segurança deve, por isso, ser aplicada a toda a cadeia alimentar, desde a produção do material primário, passando pela distribuição, até ao consumidor final (Lotta & Bogue, 2015).

É por isso imperativo o estabelecimento de um método analítico rápido, económico e altamente preciso que permita a análise de ingredientes em produtos alimentares com matrizes complexas (Koppel *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Safdar *et al.*, 2014), através da identificação e quantificação de espécies, em análises de rotina (Koppel *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014).

## **1.6 - Métodos de Análise Alimentar**

As substituições em artigos alimentares são frequentemente realizadas com produtos, física e bioquimicamente, similares (Yusop *et al.*, 2012). A impossibilidade de confirmação morfológica de diferentes espécies em produtos de comida processada destaca a importância da análise de proteínas ou ADN como suporte ao plano de rotulagem (Ballin *et al.*, 2009; Cammá *et al.*, 2012).

Estes métodos analíticos devem permitir a quantificação quer das espécies esperadas quer das espécies indevidas em produtos que apresentem matrizes complexas (Kopple *et al.*, 2009).

Dos métodos propostos para a análise de produtos alimentares (Ali *et al.*, 2012) e autenticação de espécies (Rahman *et al.*, 2014), destacam-se os seguintes:

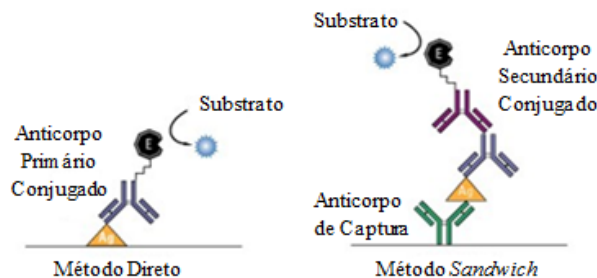
### **1.6.1 - Métodos com base em Proteínas**

As técnicas de análise proteica utilizadas incluem a identificação por eletroforese, cromatografia e técnicas imunológicas, as quais exigem a deteção de proteínas específicas de espécie (Cammá *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). Se considerarmos amostras de carne crua, estas técnicas apresentam vantagens como elevada sensibilidade e rendimento de amostra (Soares *et al.*, 2013).

#### **1.6.1.1 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

O método ELISA baseia-se na imobilização de um anticorpo ou antígeno e posterior deteção de reações antígeno-anticorpo através de enzimas capazes de converter um substrato num produto cromático (Ali *et al.*, 2011).

Os dois principais métodos utilizados, para esta finalidade, são o método indireto e o método *sandwich* (Figura 4) (Ali *et al.*, 2011).



**Figura 4** - Métodos ELISA, Direto e *Sandwich*. O antígeno de interesse é imobilizado por adsorção direta à placa de ensaio ou pela ligação a um anticorpo de captura à superfície da placa. A detecção do antígeno ocorre utilizando um anticorpo primário/secundário conjugado. Adaptado de Overview of ELISA (ThermoFisherScientific).

A técnica de ELISA pode ser aplicada quer em análises qualitativas, onde somente se verifica a presença ou ausência de determinadas proteína/péptido, quer em análises quantitativas, através da interpolação da intensidade da fluorescência com uma curva *standard* criada por diluições em série da proteína alvo (Ali *et al.*, 2011).

Alguns autores consideram que este método deixa de ser adequado em análises alimentares de rotina, dado que a atividade biológica da maior parte das proteínas é perdida após a morte do animal (Lin *et al.*, 2014). Além disso, as proteínas solúveis sofrem desnaturação aquando do processamento dos alimentos (Dolley *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014), ao serem submetidas a elevadas temperaturas e pressões (Cammá *et al.*, 2012; Yusop *et al.*, 2011; Kashani *et al.*, 2014), modificação de pH, irradiação e secagem (Bottero *et al.*, 2011). Outras restrições apontadas a este método são a disponibilidade reduzida de diferentes anticorpos para o variado leque de espécies, a possível reatividade cruzada entre espécies relacionadas (Ali *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014) e ainda a existência de proteínas específicas de tecido (Cammá *et al.*, 2012). Todos estes fatores, que afetam a sensibilidade da técnica, impossibilitam a sua aplicação em amostras compostas por múltiplas espécies (Ali *et al.*, 2011).

Verifica-se, no entanto, que o método ELISA aplicado a proteínas resistentes a elevadas temperaturas tem sido empregue comercialmente, dependendo a presença e características das proteínas alvo do tipo de células analisadas (Lin *et al.*, 2014). Os *kits* de análise baseiam-se, essencialmente, em anticorpos policlonais termo-estáveis que permitem a identificação de espécies em carnes cozinhadas, através de análise qualitativa (Dooley *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2011).

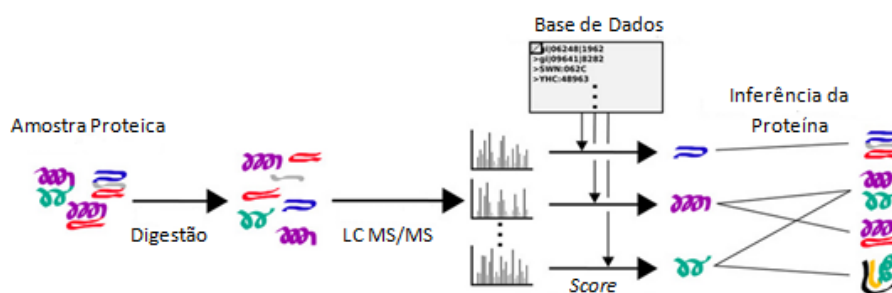
A técnica de ELISA é, apesar de tudo, um teste sensível, rápido e de baixo custo, que permite obter resultados num período de 15 minutos, podendo ser executado *in situ* (Ballin *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2011).

### 1.6.1.2 - Proteômica (Espetrometria de Massa - MS)

A espetrometria de massa permite determinar o peso molecular e a sequência de péptidos e proteínas, através da sequenciação N-terminal baseada na degradação de Edman (Figura 5) (Sentandreu & Sentandreu, 2014).

A aplicação desta metodologia é possível graças a técnicas de ionização como a MALDI e a ESI, através das quais ocorre ionização de péptidos, previamente à MS, possibilitando a sua utilização como biomarcadores (Sentandreu & Sentandreu, 2014).

Recentes avanços nesta técnica, associados à crescente informação existente acerca de sequências peptídicas e proteicas, em bases de dados, têm possibilitado a identificação de péptidos resultantes da digestão proteica em quantidades na escala das sub- $\mu$ g (Primrose *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2015).



**Figura 5** - Identificação Proteica por Espetrometria de Massa. Adaptado de Serang & Noble (2012).

A espectrometria de massa parece providenciar a especificidade necessária para a execução de análises qualitativas e quantitativas (Primrose *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2015). Por exemplo, Sentandreu *et al.* (2010) identificaram biomarcadores peptídicos para vaca, porco, frango e peru, após digestão e hidrólise de proteínas miofibrilares.

A flexível extração de péptidos e proteínas, facilita o desenvolvimento de protocolos de extração *standard*, o que aliado à resistência da estrutura primária das proteínas às rígidas condições de processamento, aumenta a confiança do processo de quantificação das mesmas (Sentandreu & Sentandreu, 2014). Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de detecção de proteínas específicas de tecido, permitindo distinguir entre tecidos da mesma espécie (Primrose *et al.*, 2010; Sentandreu & Sentandreu, 2014).

A MS aparece muitas vezes associada a técnicas de cromatografia, no entanto já é possível a aplicação direta de amostras no espectrofotômetro de massa sem necessidade de separação cromatográfica prévia (Ellis *et al.*, 2015).

Somente o custo associado à tecnologia não permite ainda a aplicação da mesma em análises de rotina (Sentandreu & Sentandreu, 2014).

## **1.7 - Métodos com base no ADN**

Só na segunda metade da década de 2000, métodos de biologia molecular de análises de ADN, à data mais complexos e dispendiosos, começaram a ganhar maior destaque nos laboratórios oficiais de controlo alimentar (Primrose *et al.*, 2010).

### **1.7.1 - O ADN**

O ADN apresenta propriedades únicas, como a sua elevada estabilidade, comparativamente a moléculas proteicas (Dooley *et al.*, 2004; Ballin *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014), a sua presença ubíqua em quase todas as células, a sua variabilidade única (Ballin *et al.*, 2009; Kashani *et al.*, 2014) e ainda a existência de sequências específicas de espécie (Cammá *et al.*, 2012). Estas características fazem dos métodos de identificação baseados no ADN favoráveis em análises de rotina e testes de autenticação alimentar (Soares *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Rogberg-Muñoz *et al.*, 2014).

Entre os métodos existentes, a PCR é considerada a técnica de maior precisão e sensibilidade, o que associado à relativa rapidez de execução justifica o enorme sucesso da sua aplicação na identificação de espécies, em distintos sectores da indústria alimentar (Amaral *et al.*, 2014; Kashani *et al.*, 2014).

Consoante a finalidade do ensaio podemos recorrer a gADN (genómico) ou mtADN (mitocondrial) (Ballin *et al.*, 2009; Ballin *et al.*, 2012).

#### **1.7.1.1 – ADN genómico (gADN) e ADN mitocondrial (mtADN)**

A fragmentação e degradação do ADN são inerentes ao processamento dos alimentos (Cammá *et al.*, 2012), o que resulta na diminuição da quantidade de ADN amplificável (Ballin *et al.*, 2009) e do tamanho dos fragmentos possíveis de analisar (Senaendreu & Sentandreu, 2014). Devemos, por isso, ter em conta que sequências de amplificação pequenas apresentam certas vantagens sobre sequências com tamanho considerável (Ali *et al.*, 2012):

- são menos afetadas pela degradação, logo há uma maior recuperação em amostras-alvo comprometidas;

- amplificam com maior eficiência e são mais facilmente separadas por eletroforese.

Diversos autores sugerem a utilização de fragmentos na ordem dos 100 a 200 pb, para a análise de amostra de comida processada (Dooley *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011; Cammà *et al.*, 2012).

Ultimamente, a análise de mtADN tem ganho especial atenção. A sua composição, livre de pseudogenes, sequências repetitivas e intrões complexos, torna-se mais organizada que a do gADN (Zha *et al.*, 2010). Na determinação de espécies, a sua principal vantagem é o elevado número de mitocôndrias presentes na maioria das células, que se reflete num menor limite de detecção (LOD), ou seja uma maior sensibilidade da PCR (Ballin *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010; Zha *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011; Ballin *et al.*, 2012; Cammà *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014), comparativamente a ensaios baseados em gADN (Ballin *et al.*, 2009). Além disso, o ADN mitocondrial, somente herdado via materna, não sofre recombinação, apresentando-se mais conservado que o gADN (Zha *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). No entanto, detém uma taxa de mutação superior (Fajardo *et al.*, 2010; Zha *et al.*, 2010; Cammà *et al.*, 2012; Sakaridis *et al.*, 2013) o que se traduz numa rápida evolução (Zha *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Isto providencia uma variação genética significativa, suficiente para a obtenção de *primers* específicos de espécie (Zha *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Ainda mais importante, a resistência do mtADN à fragmentação, favorecida pela sua forma circular (Mohamad *et al.*, 2013) após exposição a elevadas temperaturas, é superior à do gADN (Sentandreu & Sentandreu, 2014; Yang *et al.*, 2014).

Ainda que seja de extremo valor na execução de avaliações qualitativas (Bottero *et al.*, 2011), o número variável de mitocôndrias entre diferentes espécies, indivíduos da mesma espécie e até tecidos do mesmo indivíduo, complica a quantificação de ADN de uma amostra (Primrose *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011; Ballin *et al.*, 2012).

Quando realizada com gADN, a PCR pode ter como alvo sequências de cópia única ou sequência repetitivas, tais como satélites, microssatélites, minissatélites, transposões, SINE e LINE, que diferem na sua organização, localização e abundância (Ballin *et al.*, 2009). Ainda que ambas permitam efetuar quantificação, as sequências de cópia única permitem a obtenção de medições quantitativas mais coerentes (Sentandreu & Sentandreu, 2014), embora um menor LOD seja obtido com sequências repetitivas (Ballin *et al.*, 2012). Contudo, a possibilidade de encontrar regiões amplificáveis particulares de cada espécie no gADN é mais reduzida, o que facilita por vezes a ocorrência de reatividade cruzada com os sistemas de amplificação (Sentandreu & Sentandreu, 2014).

Quer numa análise qualitativa quer numa análise quantitativa, a escolha da técnica analítica, bem como da sequência de ADN a analisar têm uma grande influência no LOD e por conseguinte na sensibilidade do sistema de amplificação (ANEXO I) (Ballin *et al.*, 2009).

### 1.7.2 - Extração de ADN

A extração de ADN, cujo objetivo é a obtenção de ácidos nucleicos purificados (Somma, 2006), é um processo crítico para o sucesso da amplificação (Bustin *et al.*, 2009; Pirondini *et al.*, 2010; Demirhan *et al.*, 2012; Stefanova *et al.*, 2013).

Os produtos alimentares estão repletos de componentes que podem atuar como inibidores da amplificação de ADN (Tabela 3), como polissacarídeos, polifenóis, proteínas (Stefanova *et al.*, 2013, óleos e gorduras (Safdar *et al.*, 2015). Além disso, os processos aos quais estes produtos são sujeitos, como elevadas temperaturas e pressões, tratamentos químicos e enzimáticos, entre outros, afetam a integridade do ADN (Tung Nguyen *et al.*, 2009; Stefanova *et al.*, 2013).

**Tabela 3** - Inibidores da Reação de PCR. Adaptado de Somma, 2006.

Inibidor	Concentração
SDS	>0,005 %
Fenol	> 0,2%
Etanol	>1%
Isopropanol	>1%
Acetato de Sódio	>5mM
Cloreto de Sódio	>25mM
EDTA	>0,5mM
Hemoglobina	>1 mg/mL
Heparina	>0,15i.u/mL
Ureia	>20mM
Mistura de Reação	>15%

Um protocolo de extração deve, por isso, ser sempre otimizado para cada trabalho, por forma a não só eliminar todos os possíveis inibidores mas também assegurar que quantidades reprodutíveis de ADN sejam extraídas (Tung Nguyen *et al.*, 2009; Stefanova *et al.*, 2013; Sentandreu & Sentandreu, 2014). Mais se acrescenta que, dado não existir muita bibliografia que compare extensivamente diferentes métodos de extração (Datukishvili *et al.*, 2010), deve-se testar, num passo inicial, diferentes protocolos, por forma a encontrar o mais adequado à finalidade de cada trabalho (Tung Nguyen *et al.*, 2009).

Existem inúmeros métodos de extração conhecidos (Tabela 4), sendo que a escolha do método mais adequado recai sobre alguns critérios importantes (Somma, 2006):



- Ácido nucleico alvo da extração;
- Material de origem (tecido, material processado, etc.);
- Resultados pretendidos (concentração, pureza, etc.);
- Aplicações seguintes (PCR, clonagem, etc.).

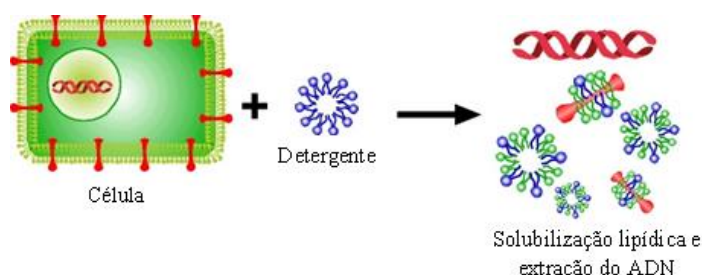
**Tabela 4** - Diferentes Métodos de Extração aplicados em amostras de carne.

CTAB modificado	Gryson <i>et al.</i> (2004) Pirondini <i>et al.</i> (2010) Stefanova <i>et al.</i> , (2013)
Fenol – Clorofórmio	Muhammed <i>et al.</i> (2015)
Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega)	Stefanova <i>et al.</i> (2013)
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)	Koppel <i>et al.</i> (2009) Koopel <i>et al.</i> (2011)
Wizard® DNA Clean-up System Kit (Promega)	Broadman & Moor (2003) Chisholm <i>et al.</i> (2008) Fajardo <i>et al.</i> (2008)
Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega)	Prado <i>et al.</i> (2009)
DNeasy Tissue Kit (Qiagen)	Farroki & Joozani (2011)
SureFood® Prep Animal X Kit (R-Biopharm)	Demirhan <i>et al.</i> (2012)
GenElute™ Mammalian Genomic DNA Extraction Kit (Promega)	Chisholm <i>et al.</i> (2008)
NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel)	Sol <i>et al.</i> (2015)

Os métodos de extração ainda que empreguem diferentes componentes químicos, baseiam-se em três princípios comuns: lise membranar; extração e precipitação.

A lise da membrana celular ocorre por utilização de soluções que incluem, por norma, um detergente iónico, como CTAB ou SDS, o qual vai lisar as membranas, por solubilização lipídica (Figura 6), e formar posteriormente um complexo insolúvel com os ácidos nucleicos, numa solução salina de baixa concentração (Somma, 2006). Os agentes quelantes, como o EDTA, são também componentes essenciais dos tampões de extração. Estes removem os iões magnésio ( $Mg^{2+}$ ), processo essencial à acção da Taq polimerase. O pH da solução de extração é mantido pela presença de um solução tampão como o Tris/HCl. A presença de um sal, como o NaCl, ajuda à precipitação do ADN, ao neutralizar a sua carga negativa, para que as moléculas se possam agregar (Somma, 2006).

Na extração por fenol-clorofórmio, a utilização de álcool, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) permite a gradual purificação do ADN ao separar por fases, orgânica e aquosa, os contaminantes e o ADN, respetivamente. Da mesma forma, no método de CTAB, os compostos contaminantes, sob ação da solução salina de baixa concentração ( $< 0,5$  M NaCl) não conseguem precipitar, podendo ser removidos na solução aquosa após adição de clorofórmio. Por forma a assegurar a completa remoção de substâncias indesejáveis, este passo pode ser repetido algumas vezes (Somma, 2006).



**Figura 6** - Rutura da membrana celular, solubilização lipídica e extração do ADN. Adaptado de Somma (2006).

As proteínas são o principal contaminante quando falamos em extração de ADN. Estas podem ser removidas por utilização de proteínase K, agente desnaturante, ou hidrocloreto de guanidina, agente caotrópico (Psifidi *et al.*, 2015) utilizado para a desnaturação e solubilização de proteínas (ProductInformation, Sigma®).

A precipitação de ADN consiste na libertação deste dos detergentes utilizados na etapa de lise. Este processo pode ser conseguido pela utilização de álcool, sendo esta etapa incluída nos protocolos de extração por Fenol-Clorofórmio e Wizard. Já no método de CTAB, a adição de isopropanol é precedida pela adição de uma solução de precipitação, composta por uma mistura de CTAB e NaCl em elevada concentração (Somma, 2006).

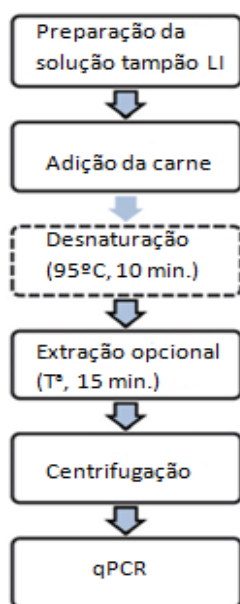
A ressuspensão dos ácidos nucleicos isolados ocorre posteriormente pela adição de água ultrapura, como por exemplo nos protocolos de Fenol-Clorofórmio e CTAB, ou tampão TE, como na extração pelo método de Wizard.

A purificação do ADN é normalmente efetuada pela incubação da solução com RNase, sendo este passo incluído nos protocolos de extração por CTAB e Wizard.

Estes métodos mais utilizados, hoje em dia, são no entanto muito morosos, envolvem a utilização de compostos perigosos para o ambiente ou requerem a compra de *kits* ou equipamentos de preços elevados (Ressman *et al.*, 2015).

Ultimamente, os líquidos iónicos (LI), sais com ponto de fusão abaixo de  $100^{\circ}\text{C}$ , têm surgido como uma solução valiosa dado permitirem dissolver biomassa, conseguindo o ADN permanecer estável

quando armazenado nos mesmos, funcionando ainda como potenciadores da PCR. Tudo isto num protocolo de rápida execução (Figura 7) (Ressman *et al.*, 2015).



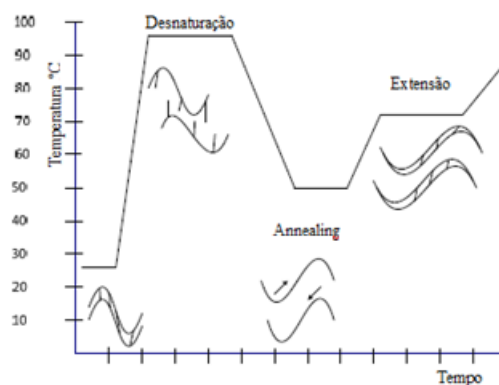
**Figura 7** - Esquema da extração com tampão iónico líquido para ADN de carne. Adaptado de Ressman *et al.* (2015).

### 1.7.3 - PCR

Foi Kary Mullis quem, em 1986, revolucionou a biologia molecular ao introduzir a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica utiliza um par de *primers*, sendo que cada um hibrida com uma cadeia da molécula de ADN alvo, multiplicando exponencialmente a região por eles delimitada (Ballin *et al.*, 2009; Kashani *et al.*, 2014). Os *primers* hibridados originam uma cadeia complementar através da adição sequencial de desoxinucleótidos, num processo composto pelas seguintes etapas (Figura 8) (Somma, 2006; Kashani *et al.*, 2014):

1. desnaturação da dsADN ( $T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ );
2. *annealing* dos *primers* ( $50\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ );
3. extensão das cadeias ( $72\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Os parâmetros que compõem o ciclo da PCR juntamente com todos os componentes, necessários para que esta ocorra - ADN alvo; *primers*; Taq polimerase; tampões de reacção;  $\text{MgCl}_2$  e desoxiribonucleótidos trifosfato - são críticos para o êxito da técnica (Somma, 2006).



**Figura 8** - Ciclo da PCR. Adaptado de Kashani *et al.* (2014).

A técnica de PCR permite amplificar uma cópia de ADN alvo, sendo, por isso, o LOD mais baixo (Cammá *et al.*, 2012) do que o observado em métodos de análise proteica, o que resulta na sua valorização, para a determinação de espécies (Ballin *et al.*, 2009). No entanto, os resultados da PCR convencional somente podem ser avaliados no final de todos os ciclos de amplificação (Rojas *et al.*, 2010; Ballin *et al.*, 2009), sendo a análise feita somente com base na dimensão dos fragmentos (Real-Time PCR Vs. Traditional PCR, Applied Biosystems). O manuseamento dos produtos amplificados aumenta, assim, o risco de contaminação e obtenção de falsos-positivos (Rojas *et al.*, 2010), além de que torna esta análise unicamente qualitativa ou, por vezes, semi-quantitativa, se forem utilizadas diluições da amostra como modelo de comparação (Ballin *et al.*, 2009).

Diversas publicações indicam a PCR como a técnica de análise que oferece a sensibilidade e especificidade desejadas na deteção de adulteração de carne e produtos derivados (Ali *et al.*, 2012; Ulca *et al.*, 2013), tendo a sua aplicação aumentado notavelmente (Sakaridis *et al.*, 2013; Ulca *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2014), tanto na análise qualitativa (*end-point PCR*), como quantitativa (*qPCR*) (Soares *et al.*, 2014).

#### **1.7.3.1 - PCR Específico de Espécie (SSP)**

Este método envolve a amplificação de um segmento de um gene através da utilização de um par de *primers* específicos de espécie, sendo depois os produtos amplificados separados em gel de agarose ou poliacrilamida (Ali *et al.*, 2012). A utilização de fragmentos pequenos permite obter uma maior especificidade e sensibilidade em estudos de autenticação alimentar de produtos processados (Fajardo *et al.*, 2010), dado que são menos afetados pela degradação, amplificam de forma mais eficiente e são mais facilmente separados por técnicas eletroforéticas (Ali *et al.*, 2012).

Foi já referenciado que fragmentos com tamanho superior a 150 pb não são indicados na análise de produtos processados. No entanto, fragmentos extremamente pequenos podem igualmente comprometer a especificidade da técnica de PCR (Ali *et al.*, 2012).

A SSP apresenta a vantagem de não ser necessária posterior confirmação por sequenciação ou análise por restrição enzimática, no entanto implica a existência de informação concreta acerca da sequência alvo da espécie em estudo, para o desenvolvimento dos *primers* (Teletchea *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010). Isto torna-a uma técnica laboriosa e de planeamento complexo (Koppel *et al.*, 2009).

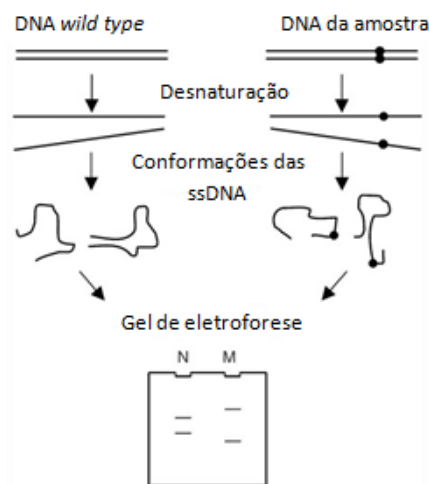
A SSP Multiplex é executada através da amplificação de uma sequência em que um dos pares de *primers* hibrida com uma região conservada da mesma e um segundo par de *primers* hibrida com uma região variável. Assim, conseguimos obter uma variedade de fragmentos com diferentes dimensões, consoante cada espécie estudada (Ali *et al.*, 2011). Este avanço na técnica SSP permite aumentar a rapidez do teste na identificação conjunta de várias espécies (Koppel *et al.*, 2011; Fajardo *et al.*, 2010). No entanto devemos ter em consideração a diferença de tamanho dos fragmentos amplificados, os quais devem diferir em cerca de 40 a 50 pb, para permitir uma resolução adequada aquando da sua separação em gel de eletroforese, aumentando a eficiência do método (Bottero *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2014). Este é um método rápido, económico e simples para análise comercial de produtos alimentares, relativamente à PCR *singleplex* (Koppel *et al.*, 2009; Kane *et al.*, 2015). Contudo, dada a complexidade do processo e as diferentes eficiências de amplificação, este método não é indicado para quantificação (Ali *et al.*, 2012). A sua sensibilidade pode ser aprimorada através da utilização de fragmentos com tamanho reduzido. No entanto, esta solução pode interferir com especificidade da técnica, levando à ocorrência de reatividade cruzada, o que diminui a sua resolução (Ali *et al.*, 2012).

Vários autores reconhecem, por isso, maior robustez, sensibilidade e precisão na SSP *singleplex* comparativamente ao método *multiplex*.

#### **1.7.3.2 – Polimorfismo Conformacional de Cadeia Única (SSCP-PCR)**

A técnica de polimorfismo conformacional de cadeia única baseia-se na relação entre a mobilidade eletroforética de uma cadeia de ADN simples e as suas possíveis conformações, processo que reflete a sua sequência nucleotídica (Teletchea *et al.*, 2009).

O produto de amplificação é desnaturado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Figura 9). As diferentes migrações da ssADN têm origem na diferença entre a sequência de ADN de diferentes amostras (Teletchea *et al.*, 2009).

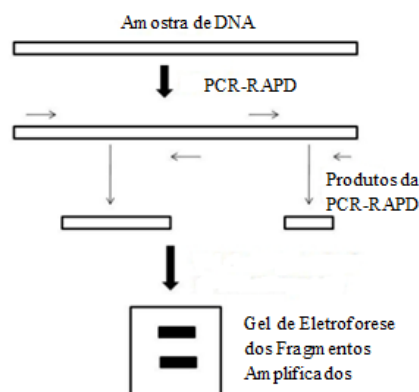


**Figura 9** - Princípio da PCR-SSCP. Adaptado de Gasser *et al.* (2003).

A restrita aplicabilidade desta técnica resulta do facto de ser sempre necessário correr as amostras juntamente com controlos e da variabilidade intra-espécie resultar em diferentes conformações, que comprometem posteriormente a sua identificação (Teletchea *et al.*, 2009).

### 1.7.3.3 – ADN Polimórfico Aleatoriamente Amplificado (RAPD-PCR)

A análise de RAPD utiliza *primers* pequenos e de sequência arbitrária (Arif *et al.*, 2010), que hibridam em diferentes localizações no genoma, produzindo um leque variado de produtos de amplificação, os quais são posteriormente separados, por tamanho, por eletroforese em gel de agarose (Figura 10) (Fajardo *et al.*, 2010), podendo ser visualizados sob luz UV (Arif *et al.*, 2010).



**Figura 10** - Princípio da Técnica de PCR-RAPD. Adaptado de Arif *et al.* (2010).

Estes *primers* permitem detetar polimorfismos na ausência de informação específica acerca da sequência nucleotídica, funcionando como marcadores (Arif *et al.*, 2010).

Esta técnica é vantajosa, uma vez que não é necessário qualquer tipo de informação acerca da sequência a analisar desde que disponhamos de material de referência, para posterior comparação. Isto torna os RAPD relevantes no estudo de espécies raras (Ballin *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010). Apesar de ser um método rápido e de simples execução, a sua reprodutibilidade é fraca (Ballin *et al.*, 2009), dado que a amplificação deve ser sempre feita sob condições *standardizadas* e controladas, como a temperatura, a concentração dos reagentes e o número de ciclos da PCR (Arif *et al.*, 2010; Fajardo *et al.*, 2010). Além disso, a qualidade do ADN extraído deve ser elevada, o que torna esta técnica limitada na análise de produtos alimentares processados (Fajardo *et al.*, 2010).

A finalidade desta técnica é ainda incompatível com o objetivo da análise de comidas processadas, uma vez que se tratando de uma amplificação não específica, não possibilita a identificação de espécies em misturas (Fajardo *et al.*, 2010).

#### **1.7.3.4 – Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP)**

A técnica de PCR-RFLP compreende a digestão enzimática, em locais de restrição específicos, do produto de amplificação resultante da PCR (Ali *et al.*, 2012). Quando submetido a eletroforese, cada espécie apresenta um padrão de fragmentos único, que permite a sua diferenciação (Ballin *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012). Esta técnica assenta no princípio de que existem regiões no genoma (nuclear e mitocondrial) que apresentam elevada variabilidade genética (Fajardo *et al.*, 2010).

A simplicidade deste método baseia-se no facto de que a utilização de um único par de *primers* permite a obtenção de um fragmento que, após uma escolha adequada das enzimas de restrição, permite a diferenciação de múltiplas espécies (Teletchea *et al.*, 2009).

Não devemos, no entanto, descuidar que podem ocorrer mutações aleatórias nos locais de restrição ou ocasionalmente uma digestão pode ocorrer apenas parcialmente, impossibilitando uma discriminação fiável (Ballin *et al.*, 2009; Teletchea *et al.*, 2009). Além disso, a escolha das enzimas de restrição requer informação prévia acerca da sequência a analisar (Teletchea *et al.*, 2009).

A PCR-RFLP apresenta vantagens como rapidez de execução, baixo custo e, em particular, adaptabilidade a análises de rotina de larga escala, o que a torna favorável aos programas de inspeção alimentar (Fajardo *et al.*, 2010).

No entanto, esta técnica apresenta reservas quando aplicada em misturas multi-espécie, dado que o perfil de *fingerprint* resultante, com numerosos fragmentos, torna difícil a sua interpretação (Ballin *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Yusop *et al.*, 2011). O facto de utilizar fragmentos com dimensões consideráveis, suscetíveis a degradação aquando do processamento dos produtos, o custo e a morosidade desta técnica tornam-na menos apelativa face à SSP (Fajardo *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012).

#### **1.7.3.5 - Sequenciação**

A sequenciação consiste na determinação da ordem das bases dos nucleótidos (A, T, G, C) que compõem determinada sequência alvo de ADN (Arif *et al.*, 2010). Ainda que a morosidade e os custos associados aos métodos tradicionais tenham sido entraves à sua aplicação como técnica primária em análises de rotina, este permanece o método de identificação mais direto e rigoroso, que permite identificar diferenças entre espécies geneticamente próximas (Fajardo *et al.*, 2010; Primrose *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012), sendo muitas vezes utilizado na confirmação de resultados após eletroforese ou qPCR (Ballin *et al.*, 2009).

Hoje em dia, os métodos de Sequenciação de Nova Geração têm sido vindo a ganhar cada vez mais importância, sendo descritos como métodos economicamente acessíveis e capazes de processar quantidades consideráveis de informação, para uma vasta gama de aplicações (Metzke, 2010).

#### **1.7.3.6 - ADN *barcoding***

O ADN *barcoding* é um sistema molecular que se baseia na amplificação de uma pequena região genética *standard* do genoma seguida de sequenciação, na identificação biológica de espécies (Ali *et al.*, 2011; Kane *et al.*, 2015).

Esta técnica emprega ainda metodologias computacionais *standard* como plataforma de apoio, permitindo o acesso a bases de dados, por forma a identificar as espécies em estudo, através da comparação com sequências de ADN referência (Fajardo *et al.*, 2010).

Um marcador genético adequado a esta função deve apresentar maior variabilidade inter-espécie que intraespécie. Vários genes mitocondriais codificantes de proteínas parecem apresentar as características necessárias para servir como marcador *barcode* (Ali *et al.*, 2011).

Para a maioria das espécies animais é utilizada uma sequência, com aproximadamente 650 pb, da região do mtADN que codifica o gene COI, o qual apresenta elevada divergência genética inter-



espécies e reduzida variabilidade genética intra-espécie (Fajardo *et al.*, 2010; Kane *et al.*, 2015). Também um segmento do gene 16S, ADN *D-loop* (422 pb), foi já utilizado como marcador na distinção de espécies de búfalo (Ali *et al.*, 2011).

Este método tem mostrado grande efetividade na identificação de múltiplas espécies animais. Contudo, não permite ainda a identificação de múltiplas espécies num produto único (Kane *et al.*, 2015).

Também o tamanho dos segmentos a amplificar é ainda considerável, o que limita a sua aplicação na análise de produtos de comida processada (Ali *et al.*, 2011). Além disso, uma vez que é necessária sequenciação posterior à amplificação, torna-se num método moroso e economicamente exigente (Ali *et al.*, 2011).

#### **1.7.3.7 - PCR em Tempo Real (qPCR)**

Recentemente, a necessidade de métodos que garantam resultados quantitativos cresceu, dada a introdução de obrigações de rotulagem estabelecidas pelas *Authorized Food Control Agencies* (Kashani *et al.*, 2014). A quantificação exata de um ingrediente revela-se de extrema importância quando (Soares *et al.*, 2014):

- o limite de contaminação accidental é estabelecido, como no caso dos OGM (quantidades < 0.9 % não é necessário rotular – *Commission Regulation EC No. 1829/2003*);
- limite máximo de um ingrediente adicionado se encontra instituído. A título de exemplo, em Portugal, é recomendado que as salsichas Frankfurt não contenham mais que 5% de proteínas vegetais, como ingrediente opcional (Soares *et al.*, 2014);
- existe necessidade de verificar a veracidade dos rótulos face às quantidades declaradas dos ingredientes utilizados.

Em consequência, a hibridação de ADN e a PCR convencional acoplada a eletroforese, ainda que precisas, mas dispendiosas e morosas, têm vindo a ser progressivamente substituídas pela PCR em Tempo Real (Zha *et al.*, 2010; Cammá *et al.*, 2012).

A qPCR foi apresentada pela equipa de Higuchi, em 1992. Esta técnica segue os princípios gerais da PCR, contudo emprega uma molécula repórter fluorescente na monitorização contínua (Fajardo *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010; Yusop *et al.*, 2012) da amplificação em cada ciclo de reação, possibilitando tanto a deteção como a quantificação, em teoria, de sequências específicas em misturas complexas (Ballin *et al.*, 2009; Kashani *et al.*, 2014).

Durante as últimas décadas, as aplicações da qPCR têm vindo a alterar rapidamente a natureza da ciência molecular, tendo-se tornado uma das ferramentas mais utilizadas na pesquisa em genética

molecular, ao permitir a manipulação específica, sensível e reprodutível de ácidos nucleicos, combinando os passos de amplificação e detecção dos mesmos (Kashani *et al.*, 2014).

Além da rapidez e especificidade, a qPCR parece ser o melhor teste de rotina dada a possibilidade que apresenta de discriminar várias espécies simultaneamente (PCR *multiplex*), através da utilização de marcadores distintos, permitindo analisar matrizes complexas (Ballin *et al.*, 2009; Bottero *et al.*, 2011) e reduzindo os custos e o tempo inerente ao mesmo (Ali *et al.*, 2012), o que a torna na técnica ideal para a análise de produtos comerciais (Safdar *et al.*, 2015).

Relativamente à sensibilidade da técnica, e em particular na área alimentar, devemos ter em atenção que esta pode, em contrapartida, dificultar a pertinente distinção entre contaminação cruzada e práticas fraudulentas (Primrose *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011). Por exemplo, a presença de ADN bovino em queijo *mozzarella* puro de búfala, manufaturado sob controlo restrito, foi atribuída a contaminação cruzada, uma vez que o leite de ambas as espécies era processado no mesmo local (Bottero *et al.*, 2002). Isto revela a importância, particularmente no caso de produtos DOP, da separação completa das linhas de processamento de produtos com base em espécies diferentes (Bottero *et al.*, 2011).

Devemos ainda ter em consideração o tamanho dos fragmentos alvo para a análise qPCR, sendo que é aconselhável os mesmos apresentarem tamanhos inferiores a 150 pb (Mohamad *et al.*, 2013).

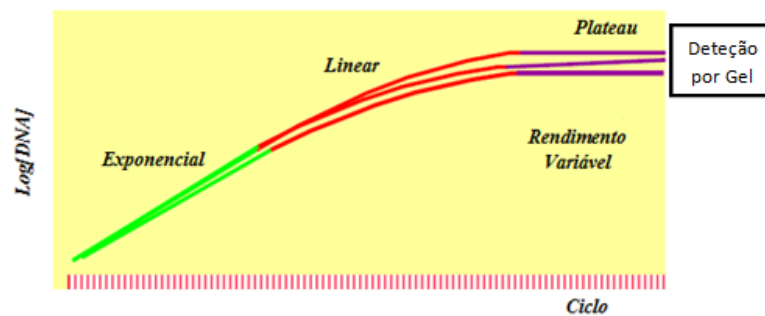
#### 1.7.3.7.1 - qPCR-HRM

A análise HRM permite genotipagem e *fingerprinting*, através da discriminação de variantes de uma sequência de ADN, tais como SNPs e pequenas deleções e inserções, com base na forma das curvas resultantes das transições na temperatura de *melting* dos produtos de amplificação da qPCR (Skaridis *et al.*, 2013).

#### 1.7.3.7.2 - Quantificação

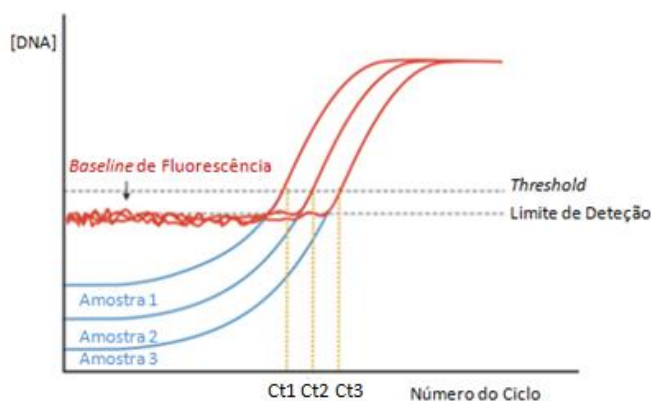
A possibilidade de executar quantificação é a principal vantagem da qPCR face à PCR convencional (Soares *et al.*, 2013), permitindo este método quantificar vestígios ínfimos de espécies de carne em produtos alimentares (Sentandreu & Sentandreu., 2014; Kane *et al.*, 2015).

A quantificação ocorre com o ADN da fase exponencial da PCR (Figura 11), através da relação entre a fluorescência (RFU) e o número do ciclo (Ct) de amplificação, numa escala logarítmica, sendo Ct a designação atribuída ao número do ciclo no qual a fluorescência atravessa um limite (*threshold*) de fluorescência (Ali *et al.*, 2012).



**Figura 11** - Fases da PCR. Adaptado de Real-Time PCR Vs Tradicional PCR. Applied Biosystems.

Como podemos ver na figura 12, três amostras distintas com igual concentração de ADN inicial, apresentam diferentes rendimentos no final da PCR, o que mostra diferentes eficiências de amplificação. Logo, a medição da concentração de ADN na fase exponencial (qPCR) torna-se mais precisa do que no final (PCR convencional) dos ciclos (Real-Time PCR Vs Tradicional PCR, Applied Biosystems).



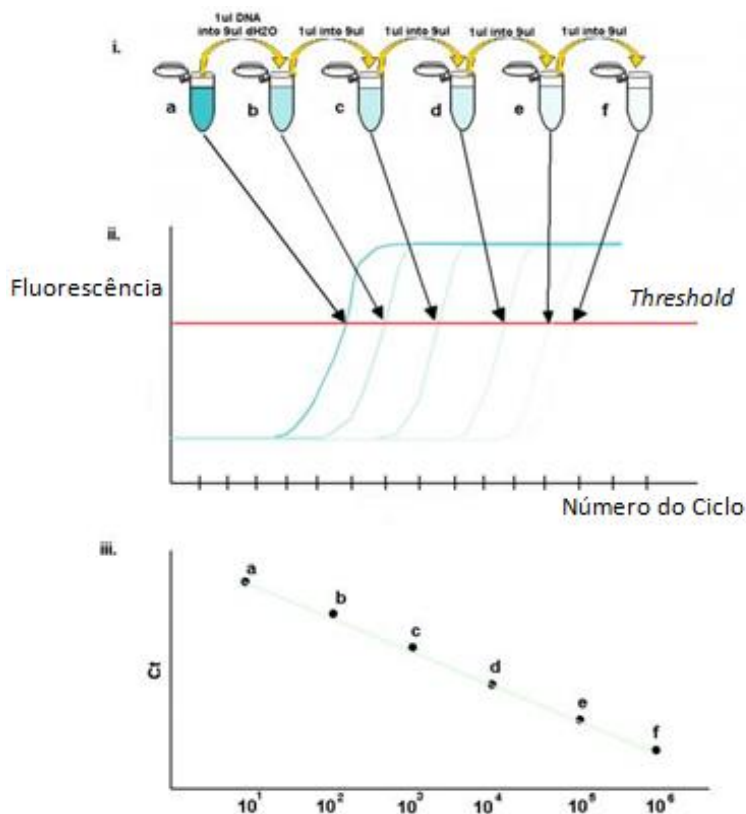
**Figura 12** - Princípio da detecção de fluorescência em tempo real e medição da concentração dos alvos da qPCR através do Ct (Ciclo de Threshold). Adaptado de “Introduction to Quantitative PCR. Methods and Applications Guide.” Agilent Technologies. (2012).

Existem diversas formas de executar quantificação, podendo esta ser absoluta ou relativa (Mohamad *et al.*, 2013).

### 1. Curva Standard (absoluta)

A análise quantitativa é feita através da interpolação da amplificação (Ct) de uma sequência alvo numa amostra desconhecida com a curva de calibração (*curva standard*), obtida a partir da amplificação de um conjunto de diluições em série (concentrações conhecidas) de ADN (Figura 13i.) (Fajardo *et al.*, 2010; Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide, 2012; Mohamad *et al.*, 2013).

A curva *standard* é obtida através da correlação entre o logaritmo da quantidade inicial de ADN e o número de Ct gerado, para cada diluição (Figura 13iii.), devendo a curva consistir em pelo menos 4 pontos distintos (Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide, 2012).



**Figura 13** - Construção da curva *standard* através da amplificação de diluições em série de concentrações de ADN conhecidas: i) diluições em série; ii) curvas de amplificação da qPCR; iii) curva *standard*. Adaptado de University of Northern British Columbia, “Gene Expression”.

## 2. Método $\Delta C_t$ (relativa)

Em amostras alimentares, vários são os aditivos que podem funcionar como inibidores da PCR, impedindo a ligação dos *primers* aos locais específicos e reduzindo a eficiência da amplificação (Rojas *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2014). A reatividade cruzada entre *primers* específicos de espécie e ADN de outras espécies é também um inconveniente inerente à qPCR (Rojas *et al.*, 2010; Cammá *et al.*, 2012;). Além disso, a degradação do ADN e consequente diminuição de ADN amplificável resultante do processamento do produto, influencia o processo de quantificação (Ballin *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Sentandreu & Sentandreu, 2014). A normalização, processo no qual ocorre amplificação simultânea de uma amostra de concentração conhecida e um controlo de ADN não degradado, permite fazer face a estes fatores, resultando numa quantificação mais precisa (Ballin *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010; Primrose *et al.*, 2010).

Este processo inclui o desenvolvimento conjunto de *primers* específicos de espécie e *primers* controlo endógeno (sequência controlo) (Soares *et al.*, 2013).

A utilização de uma sequência controlo, como a região conservada 18S rARN, apresenta várias finalidades (Rojas *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013):

- controlo positivo da totalidade de ADN amplificável presente na amostra, o que permite considerar todos os fatores de inibição da PCR;
- rastreio da presença de ADN não amplificado pelos *primers* e sondas específicos de espécie;
- as imprecisões causadas pela utilização de *standards* e amostras desconhecidas pode ser deduzida, pela comparação dos valores de Ct dos sistemas de PCR, específico de espécie e do controlo endógeno.

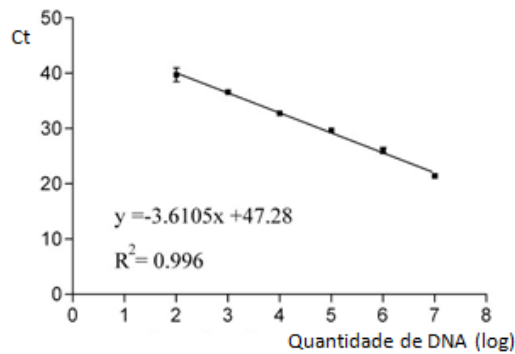
Assim, na quantificação relativa utilizamos padrões com concentrações conhecidas e estabelecemos comparação entre a amplificação da sequência alvo presente nas amostras e a amplificação da sequência do gene de referência da amostra controlo. No final obtemos uma curva que resulta da correlação entre  $\Delta Ct$  (diferença entre o Ct do gene de referência e o Ct do gene alvo) e o logaritmo da quantidade de ADN alvo a analisar (Mohamad *et al.*, 2013).

Dois sistemas de normalização foram desenvolvidos com base no gene da miostatina (MY) e no gene da hormona de crescimento bovina (BGH), respetivamente por Laube *et al.* (2003) e Brodmann & Moor (2003).

A análise da equação da reta de regressão linear (curva padrão) permite avaliar a eficiência da amplificação. Para tal consideramos 2 pontos essenciais (Bustin *et al.*, 2009; Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide, 2012; Soares *et al.*, 2013):

- Linearidade da Curva – avaliada pelo Coeficiente de Correlação de Pearson ( $R^2$ ) (Figura 14) – este valor deve ser bastante próximo de 1 ( $\geq 0,985$ ). Uma curva linear representa uma forte correlação entre as duas variáveis.
- Eficiência da Amplificação – calculada a partir do valor do declive da curva padrão (Figura 14), segundo a fórmula:  $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$

Este valor é normalmente apresentado em %, devendo situar-se entre 90% e 110%.



**Figura 14** - Curva Standard da PCR em Tempo Real. Adaptado de Iotti *et al.* (2012).

Outro aspeto que dificulta a execução de análises quantitativas é a diferença na quantidade de ADN extraído que resulta não só da localização do gene escolhido para a análise (Primrose *et al.*, 2010), das diferenças entre tecidos ou órgãos, que podem variar em densidade celular, mas também das diferenças entre espécies (Ballin *et al.*, 2009).

Na prática, todos os fatores até agora referidos que podem interferir com a quantificação de ADN são alheios ao investigador (Ballin *et al.*, 2009; Koppel *et al.*, 2012). Assim, a quantificação analítica de ADN de uma espécie não permite estabelecer uma correlação linear com o conteúdo em massa (w/w) da amostra analisada (Ballin *et al.*, 2009; Koppel *et al.*, 2012). Alguns autores sugerem, por isso, que esta correlação seja feita em equivalentes genoma/genoma, tendo por base sequências de cópia única de gADN, ainda que o LOD seja comprometido face ao mtADN e sequências repetitivas (Ballin *et al.*, 2009; Sentandreu & Sentandreu, 2014).

Não obstante as inconveniências citadas anteriormente, vários estudos foram já publicados em que a correlação (w/w) é estabelecida, o que se justifica com as seguintes razões (Ballin *et al.*, 2009):

- interesse público em resultados experimentais acessíveis;
- pretensão dos órgãos legislativos no estabelecimento de valores percentuais limite para a presença de determinadas espécies por massa de produto (União Europeia, 2003);
- necessidade de controlar os rótulos dos produtos que indicam o conteúdo de carne em (w/w).

A qPCR surge, assim, na indústria alimentar, como o meio de verificação mais preciso na identificação dos ingredientes constituintes de um produto. A extensa utilidade e diversidade de áreas em que se pode aplicar fazem desta técnica uma das mais acessíveis a todos os laboratórios e indústrias, com aplicação na investigação e programas de inspeção (Kashani *et al.*, 2014).

#### 1.7.4 - Métodos de Detecção na qPCR

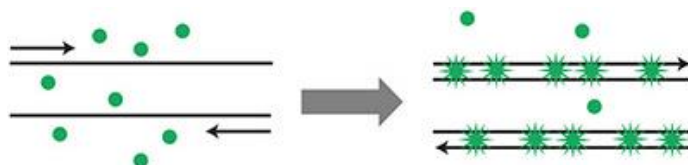
Existem diferentes procedimentos baseados em fluorescência desenvolvidos para a detecção de produtos de amplificação em qPCR (Yusop *et al.*, 2012; Kashani *et al.*, 2014). A principal vantagem na utilização de fluorescência na detecção de sinal é que permite eliminar a necessidade de executar um gel de eletroforese, para análise dos resultados (Dooley *et al.*, 2004).

Existem diferentes metodologias de detecção associadas à qPCR, que se baseiam em dois formatos (Fajardo *et al.*, 2008):

##### 1.7.4.1 - Corantes fluorescentes intercalantes (exs: SYBR® Green I; Eva Green).

A utilização de corantes intercalantes de ADN apresenta-se como um método flexível, o qual não envolve o desenho de sondas (Soares *et al.*, 2013).

Estes marcadores iniciam a emissão de fluorescência uma vez ligados à dsADN (Ballin *et al.*, 2009; Mohamad *et al.*, 2013). Durante os ciclos da PCR, as sequências de dsADN, produto da amplificação, vão acumulando marcador fluorescente, aumentando a intensidade da fluorescência proporcionalmente à concentração de dsADN em solução (Figura 15) (Ballin *et al.*, 2009; Kashani *et al.*, 2014).



**Figura 15** - Mecanismo de ação do marcador intercalante SYBR® Green I. Adaptado de A Technical Guide to PCR Technologies. SigmaAldrich®.

Uma das suas vantagens é o facto de este permitir a verificação da especificidade dos produtos amplificados, através da interpretação das curvas de *melting*, que possibilitam a distinção de mutações e deleções (Ballin *et al.*, 2009) e ainda a formação de artefactos, como dímeros de *primers* (Kashani *et al.*, 2014).

O método mais simples, barato e com um sistema de fluorescência direto, adaptado à qPCR envolve a incorporação do marcador SYBR® Green I (Soares *et al.*, 2013). A sua fluorescência, revelada sob luz UV, aumenta consideravelmente quando este se encontra intercalado na *minor groove* da molécula de dsADN (Ballin *et al.*, 2009; Fajardo *et al.*, 2010; Kashani *et al.*, 2014).

No entanto, a marcação de ADN com SYBR Green I é inespecífica. Além disso, foi já reportado que esta corante interfere com a reacção de PCR, pelo que concentrações reduzidas do mesmo devem ser utilizadas (Mohamad *et al.*, 2013).

Outro corante também muito utilizado é o EvaGreen. Tal como o SYBRGreen, este corante intercala-se na *minor groove* da dsADN, destacando-se do SYBRGreen ao apresentar maior sensibilidade e maior eficácia de otimização. Além disso, permite a detecção de diferentes produtos de amplificação, tem menor efeito inibidor na reacção de PCR e a probabilidade de gerar produtos não específicos é menor (Safdar & Abasiyanik., 2013; Safdar *et al.*, 2014).

#### **1.7.4.2 - Sondas fluorescentes**

Geralmente apresentam cerca de 27 nucleótidos de extensão e uma temperatura de *melting* cerca de 8° C a 10°C superior à dos *primers* (Mohamad *et al.*, 2013).

##### **1.7.4.2.1 - Sondas de hidrólise (ex: TaqMan®)**

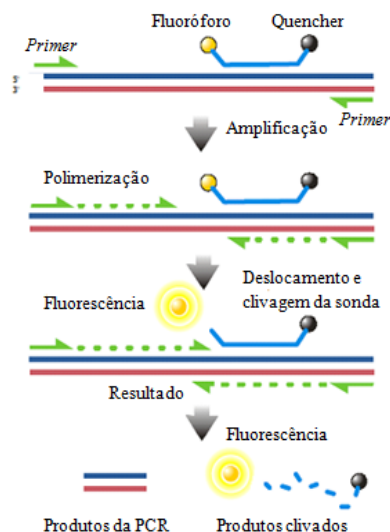
Desenhadas para aumentar a especificidade da qPCR, sendo representadas pela química da sonda *TaqMan*. Aliada à utilização de dois *primers*, *forward* e *reverse*, a tecnologia *Taqman*® utiliza uma sonda marcada, na extremidade 5' com um fluoróforo e na extremidade 3' com um marcador *quencher*, que hibrida com a sequência alvo entre os dois *primers* (Ballin *et al.*, 2009). A atividade 5'-3' exonuclease da polimerase conduz à hidrólise da sonda, separação do fluoróforo e do *quencher*, e consequente libertação de fluorescência (Figura 16).

O sinal resultante permite a medição quantitativa do produto acumulado durante a fase exponencial da PCR (Dooley *et al.*, 2004; Ballin *et al.*, 2009; Kashani *et al.*, 2014).

De todos os métodos, a tecnologia das sondas *TaqMan*® é particularmente promissora dado que, a somar à especificidade dos *primers*, uma maior especificidade é providenciada pela sonda, elevando a fiabilidade do ensaio (Ali *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo, permite aumentar o limite de detecção do ensaio e é menos propícia à formação de dímeros de *primers*, comparativamente ao método anterior (Ballin *et al.*, 2012; Yusop *et al.*, 2012).

A utilização de sondas de hidrólise *TaqMan*® e a amplificação de pequenos fragmentos de ADN (Ali *et al.*, 2012) são preferíveis na análise quantitativa de produtos processados, dado o seu estado de degradação e complexidade (Soares *et al.*, 2014). Esta técnica tem sido reportada por diferentes autores como o método mais rápido e sensível na identificação de espécies em misturas complexas (Cammá *et al.*, 2012).





**Figura 16** - Mecanismo da ação da sonda TaqMan®. Adaptado de “Introduction to Quantitative PCR. Methods and Applications Guide”. Agilent Technologies (2012).

#### 1.7.4.2.2 - Sondas *Hairpin* (ex: Molecular Beacons)

As *molecular beacons* são as sondas *hairpin* mais simples. Consistem numa estrutura com uma região em forma de *loop* composta por *primers* específicos para uma sequência flanqueados por duas sequências repetitivas invertidas (Kashani *et al.*, 2014).

Ligados covalentemente a cada sequência encontram-se um fluoróforo repórter e um *quencher*. A proximidade entre estes impede que a libertação de fluorescência pelo fluoróforo. Aquando da ligação da sonda à sequência alvo, a sua separação permite a libertação de fluorescência (Figura 17) (Mohamad *et al.*, 2013).



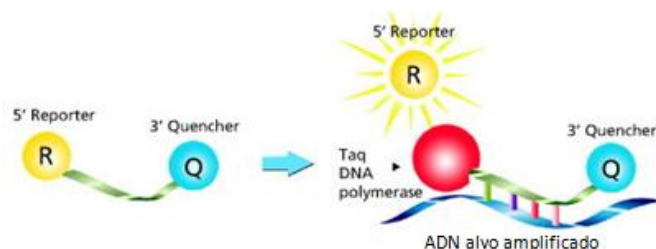
**Figura 17** - Mecanismo de ação das sondas Molecular Beacons. Adaptado de A Technical Guide to PCR Technologies. Sigma Aldrich®.

Estas sondas mostraram apresentar menos *background* de fluorescência inicial, comparativamente às sondas TaqMan®, devido à sua arquitetura (Yusop *et al.*, 2012). A tecnologia das sondas TaqMan®, dada a distância intramolecular entre o fluoróforo e o *quencher*, quando não hibridadas à sequência de ADN, apresentam um *quenching* parcial, o que resulta num maior *background* inicial de fluorescência (Yusop *et al.*, 2012).

Assim, as *Molecular Beacons* permitem resolver a inespecificidade de marcadores intercalantes e o *background* de fluorescência excessivo de sondas de hidrólise (Yusop *et al.*, 2012).

#### 1.7.4.2.3 - Sondas de hibridação marcadas com fluorescência (ex: FRET)

As sondas FRET são fragmentos de ADN ou ARN utilizados para detetar a presença de sequência nucleotídicas complementares à sequência da sonda. Estas sondas podem ser utilizadas em ensaios experimentais de 3 ou 4 oligonucleótidos. No segundo método, os *primers* e as sequências específicas de sondas ligam-se perto umas das outras numa conformação cabeça-cauda. Para assegurar a hibridação da sonda à sequência-alvo, esta é marcada com radioatividade ou com um marcador fluorescente (Figura 18) (Kashani *et al.*, 2014).



**Figura 18** - Mecanismo de acção das sondas FRET. Adaptado de Dual-Labeled Probes. How Dual-Labeled Probes Work Sigma-Aldrich®.

#### 1.7.5 - Marcadores Moleculares na Autenticação de Produtos Cárneos

A escolha do marcador genético é extremamente importante (Fajardo *et al.*, 2010; Bottero *et al.*, 2011), apresentando cada um as suas próprias vantagens e desvantagens (ANEXO II). A enorme variabilidade de genes mitocondriais existente permite uma identificação fidedigna ao nível da espécie (Bottero *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2013). Estes têm sido largamente utilizados em estudos filogenéticos, aumentando o número de sequências de referência em bases de dados e permitindo uma melhor avaliação da variabilidade *intra* e *inter* específica (Teletchea *et al.*, 2009; Bottero *et al.*, 2011).

O gene do *citocromo b*, presente no mtADN, é o gene universalmente mais utilizado em análises de identificação (Dooley *et al.*, 2004; Teletchea *et al.*, 2009; Yusop *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2014). As últimas análises de identificação de espécies, baseadas no *citocromo b*, mostraram uma reconstrução mais precisa e com elevada resolução da filogenia dos mamíferos, devido à elevada taxa de conservação *intra*-espécies e à considerável variabilidade da sua sequência *inter*-espécies

(Yusop *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2014; Muhammed *et al.*, 2015). Isto é possível devido à presença de regiões conservadas e regiões de elevada variabilidade presentes neste gene (Teletchea *et al.*, 2009; Mohamad *et al.*, 2013).

Também os genes COII, ATPase 8, as subunidades ribossomais, 12S e 16S, e a região *D-loop* são dos marcadores mais utilizados na detecção específica de espécies com base no de mtADN (Fajardo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

Fazendo referência ao ADN genómico, podemos apontar o gene da hormona do crescimento (GH), o gene da actina, o gene do recetor da melanocorticon 1 (MCR1) e ainda o gene 18 srARN, como os mais utilizados em análises de discriminação de espécies (Fajardo *et al.*, 2010; Mohamad *et al.*, 2013).



## 2. Objetivos

A avaliação da autenticidade de produtos cárneos consiste na identificação da substituição de espécies com elevado valor económico por outras de menor valor e da presença de espécies não declaradas no rótulo. Para este trabalho, deu-se ênfase a quatro espécies principais, *Sus scrofa* (porco), *Bos taurus* (vaca), *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha).

Esta dissertação teve como objetivo a otimização de diferentes técnicas de biologia molecular que permitam a identificação de diferentes espécies de carne, seguindo-se a aplicação das mesmas na avaliação da autenticidade de amostras comerciais.

A seleção da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseou-se no facto de esta se ter vindo a destacar em termos de especificidade, rapidez e sensibilidade na identificação de espécies em produtos alimentares, face às demais técnicas laboratoriais.

Numa primeira etapa foram utilizadas amostras de carne fresca na comparação da eficiência de diferentes metodologias de extração de ADN, por forma a seleccionar a mais eficaz para a posterior extração de ADN de amostras comerciais.

Seguidamente, diferentes metodologias de amplificação foram testadas, procedendo-se por fim à aplicação das técnicas qualitativa (PCR com *primers* específicos) e quantitativa (PCR em tempo real) na avaliação das amostras comerciais adquiridas, para a presença das espécies seleccionadas para o estudo.

Com este trabalho pretendeu-se ainda enfatizar a necessidade de boas práticas de produção alimentar, valorizar tanto os produtos como os produtores que seguem à regra as condições necessárias para um comércio justo e acima de tudo destacar a importância de tudo isto para o consumidor.



### **3. Material e Métodos**

De forma a evitar a contaminação durante a extração de ADN, preparação das soluções e das misturas de amplificação várias medidas foram cumpridas. Para tal, todo o equipamento, bem como bancadas e câmaras de extração e PCR foram sujeitos a esterilização, previamente a qualquer etapa do trabalho. Além disso, outras medidas de prevenção foram tomadas:

- ✓ Mudança constante de luvas;
- ✓ Extração de ADN e preparação das misturas da PCR realizadas em salas distintas;
- ✓ Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau de pureza apto para utilização em biologia molecular.

#### **3.1 - Reagentes e Soluções**

##### **3.1.1 - Preparação das Soluções**

- **Tampão TE 0,5X (100 mL)**

Adicionaram-se 1 mL de Tris 1M (pH 8) e 0,2 mL de EDTA 0,5M a 80 mL de água desionizada, obtendo-se uma solução de TE 1X.

Armazenou-se à Temperatura ambiente.

- **Tris 1M (100 mL)**

Pesaram-se 12,114 g de Tris 1M e adicionou-se a 80 mL de água desionizada. O pH foi ajustado a 8, com adição de HCl. Perfez-se o volume de 100 mL adicionando água desionizada.

- **Solução de EDTA 0,5 M (100 mL)**

Pesaram-se 18,612 g de EDTA e adicionaram-se a 80 mL de água desionizada, agitando vigorosamente com o agitador magnético. Ajustou-se o pH a 8, com adição de NaOH. Perfez-se o volume de 100 mL com água desionizada.

Armazenou-se à Temperatura ambiente.

- **Tampão de Extração (Extração com Purificação Wizard) (500 mL)**

Pesaram-se 0,605g de Tris, 4,385 g de NaCl, 0,37 g de EDTA e 5 g de SDS, adicionando-se 400 mL de água desionizada. Ajustou-se o pH a 8, adicionando HCl. Perfez-se o volume de 500 mL adicionando água desionizada.

Armazenou-se à Temperatura ambiente.

- **Solução de Hidrocloreto de guanidina (Gu-HCl)**

Dissolveram-se 4,78 g de Gu-HCl em 10 mL de água desionizada.

Armazenado à Temperatura ambiente.

- **Solução de Isopropanol a 80%**

Adicionar 80 mL de Isopropanol 100% a 20 mL de água desionizada.

Armazenado a 4°C.

- **Solução de Precipitação CTAB**

Pesaram-se 1 g de CTAB e 0,5 g de NaCl que foram dissolvidas em 100 mL de água desionizada.

Ajustou-se o pH a 8 com NaOH. Perfez-se o volume de 200 mL adicionando água desionizada.

Armazenado a 4°C.

- **Solução de NaCL 1,2 M**

Pesaram-se 7 g de NaCl e dissolveram-se em 100 mL de água desionizada.

Armazenado à Temperatura ambiente.

- **Tampão TBE 1X**

Diluíram-se 10 mL de TBE 10X (Lonza) em 90 mL de água destilada.



### 3.2 - Amostras

Numa primeira fase, as amostras de carne analisadas foram adquiridas no “Talho do Centro” (Viseu). As espécies selecionadas para este trabalho foram *Sus scrofa* (porco), *Bos taurus* (vaca), e *Ovis aries* (ovelha) (Tabela 5). A seleção destas três espécies baseou-se no facto de serem os tipos de carne vermelha mais produzidos em Portugal (Estatísticas Agrícolas, 2014). Além disso, foi igualmente estudada a carne de cavalo, *Equus caballus* (Tabela 5), não só devido aos escândalos que se verificaram nos últimos anos com a utilização fraudulenta desta espécie (Yamoah & Yawson, 2014), mas também devido ao aumento do seu consumo no nosso país.

A identificação da espécie referente a cada amostra recolhida encontra-se discriminada no Anexo III, sendo esta identificação reconhecida por uma pessoa responsável do estabelecimento em concreto (Anexo VI).

**Tabela 5** - Identificação das amostras controlo das espécies utilizadas neste trabalho.

Amostras	Espécies
V	<i>Bos taurus</i>
P	<i>Sus scrofa</i>
C	<i>Equus caballus</i>
O	<i>Ovis aries</i>

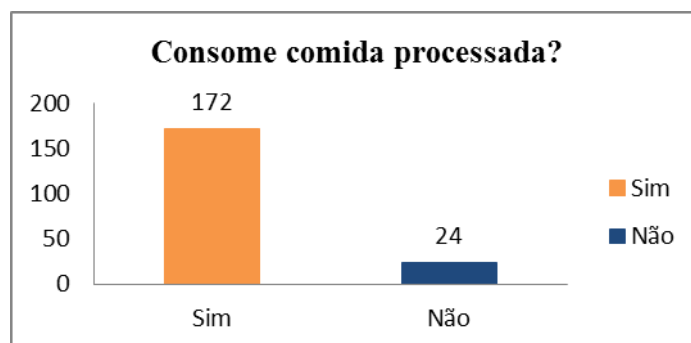
As porções de carne de onde as amostras foram recolhidas consistiam em tecido muscular.

Além das amostras de carne fresca, foram igualmente adquiridas amostras de produtos à base de carne de bovino comerciais (Tabela 6), selecionadas com base nos dados adquiridos através de um inquérito *online* dirigido à comunidade académica da Universidade de Aveiro. Este inquérito, cuja finalidade era selecionar os produtos alimentares a adquirir nas superfícies comerciais, foi efetuado entre março e setembro de 2015, tendo-se obtido um total de 196 respostas, que permitiram obter uma amostragem significativa da comunidade universitária.

**Tabela 6** - Descrição das amostras comerciais testadas.

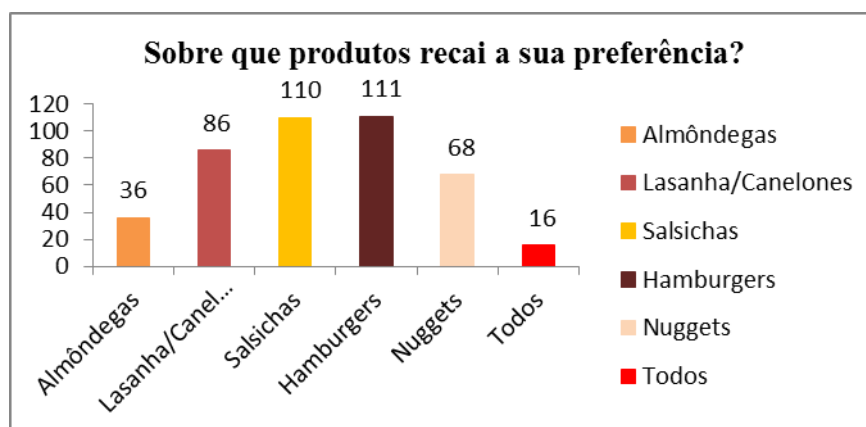
Amostra	Processamento	Marca	Espécie Rotulada
A1	Processada	McDonald's	100% Carne de Vaca
A2		Burger King®	100% carne de Vaca
A3	Não processada	Iglo	65% Carne de Vaca + Proteínas Vegetais
A4		Pingo Doce	60% Carne de Vaca

Desta amostra da comunidade estudante verificámos que 172 (87,8%) admitiram consumir produtos à base de alimentos processados (Figura 19).



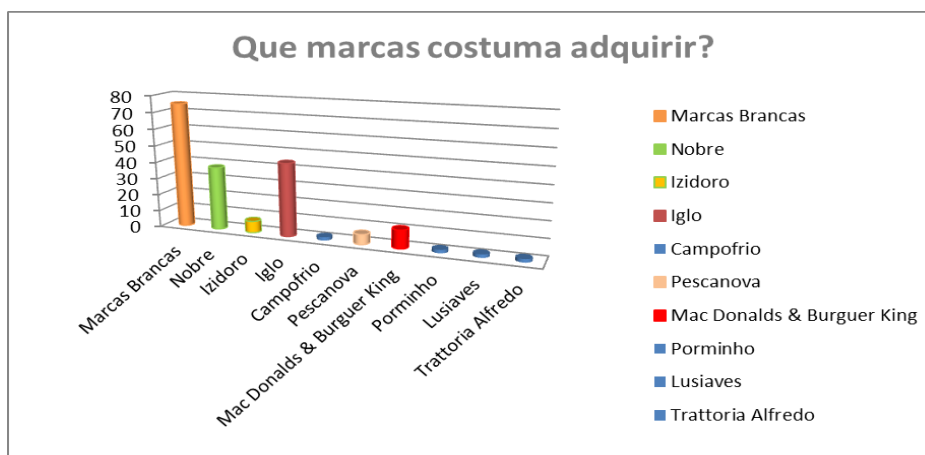
**Figura 19** - Número de inquiridos que consome comida à base de carne processada.

Pudemos também apurar que os hambúrgueres são o alimento mais frequentemente adquirido seguidos pelas salsichas, sendo referenciado por 56,3% e 55,8% dos inquiridos, respetivamente (Figura 20).



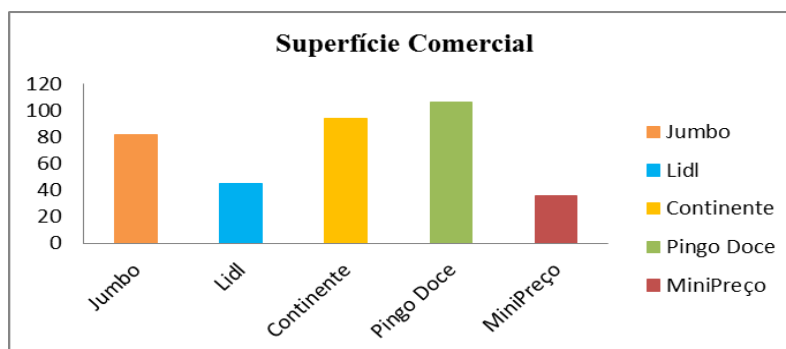
**Figura 20** – Principais produtos à base de carne processada adquiridos.

Ainda que múltiplas opções de marcas alimentares tenham sido referenciadas pela maior parte dos inquiridos, observa-se uma preferência significativa pelas marcas brancas, aparecendo em segundo lugar a marca Iglo (Figura 21).



**Figura 21** - Principais marcas de produtos processados adquiridas.

No que toca ao local de aquisição dos produtos alimentares, o Pingo Doce surge como preferência entre os estudantes da Universidade de Aveiro (Figura 22).



**Figura 22** - Principais superfícies comerciais de aquisição de produtos processados.

De maneira a organizar o estudo, a nossa análise recaiu sobre os hambúrgueres como alimento comercial teste. Nesta área quatro tipos diferentes foram analisados, como podemos ver descriminado na tabela 6.

Todas as amostras, uma vez recolhidas, foram acondicionadas e armazenadas a -20 °C, por forma a evitar a degradação enzimática do ADN.

### **3.3 - Homogeneização de Tecidos e Extração de ADN**

#### **3.3.1 - Homogeneização do Tecido Animal**

Para homogeneizar as amostras de tecido recolhidas, previamente à extração de ADN, procedeu-se segundo as etapas iniciais propostas pelo protocolo “*illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit*”, com algumas alterações. Para tal, as amostras recolhidas, ainda congeladas, foram colocadas num almofariz e, após adição de 60 µL de PBS, estas foram homogeneizadas com pilão.

#### **3.3.2 - Protocolos de Extração de ADN**

##### **3.3.2.1 - Extração de ADN pelo método Fenol-Clorofórmio**

O método de extração Fenol-Clorofórmio foi aplicado segundo o procedimento descrito por Smabrook *et al.* (1989).

Após homogeneização, 200 mg de amostra foram colocadas num tubo de reação de 1,5 mL. Adicionou-se 500 µL de Tampão DLB, para solubilizar os compostos. Posteriormente adicionou-se 50 µL de SDS 10% e 50 µL de Proteínase K (20 mg/mL), para desnaturação e hidrólise das proteínas, e as amostras foram incubadas *overnight*, a 56°C, com agitação ligeira. Com o objetivo de remover as proteínas desnaturadas, adicionaram-se depois 20 µL de NaCl 5M, e 575 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), incorporando toda a mistura por inversão. Após centrifugação, durante 3 minutos a 12 000 rpm, a fase superior foi recolhida para um novo tubo de reação de 1,5 mL, sendo acrescentado à mesma 575 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi novamente centrifugada, durante 3 minutos a 12 000 rpm, sendo a fase superior recolhida para um novo tubo de reação de 1,5 mL. Nesta fase procedemos à purificação do ADN extraído. Para tal, acrescentámos 1000 µL de etanol a 96% (armazenado a -20°C), deixando repousar durante 1 hora, a -20°C. Seguiu-se nova centrifugação, durante 15 minutos a 10 500 rpm. Após rejeitar o etanol, o precipitado foi deixado a secar. Por fim, dissolveu-se em 100 µL de água ultra pura esterilizada e incubou-se a solução a 37°C durante pelo menos 2 horas. As amostras de ADN extraídas foram conservadas a -20°C, para uso posterior.

##### **3.3.2.2 - Extração de ADN pelo método de CTAB modificado**

O método de extração de CTAB foi aplicado segundo o protocolo descrito por Stefanova *et al.* (2013).

200 mg de amostra homogeneizada foram pesadas e colocadas num tubo de reação de 2 mL. Adicionaram-se 400 µL de água desionizada, 1000 µL de Tampão de Extração CTAB e 20 µL de Proteínase K (20 mg/mL). As amostras foram vortexadas e deixadas a incubar durante 60 minutos a 65°C. Posteriormente adicionaram-se 20 µL de RNase A (10mg/mL), homogeneizaram-se as amostras e incubou-se novamente a 65°C durante 10 minutos. Após centrifugação, a 16.000 g durante 10 minutos, o sobrenadante (1000 µL) foi transferido para um novo tubo de reação de 2 mL. Adicionaram-se 800 µL de clorofórmio, vortexaram-se as amostras vigorosamente e centrifugaram-se, a 16.000 g durante 10 minutos, repetindo-se novamente esta última sequência de eventos. O sobrenadante foi depois misturado com o dobro do volume do Tampão de Precipitação CTAB e incubou-se 60 minutos à temperatura ambiente. Depois de centrifugar a amostras a 16.000 g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 700 µL de NaCl 1,2 M e extraído com igual volume de clorofórmio. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras a 16.000 g durante 10 minutos e recolheu-se a fase superior para um novo tubo de reação de 2 mL. Adicionou-se 0,6 partes de volume de isopropanol e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de centrifugar, a 16.000 g durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 1000 µL de etanol a 70%. Centrifugaram-se as amostras a 16.000 g durante 10 minutos, tendo-se descartado o sobrenadante e secado o *pellet* a 37° C, durante 30 minutos. Este foi por último dissolvido em 100 µL de H<sub>2</sub>O desionizada e as amostras armazenadas -20 °C.

### **3.3.2.3 - Extração de ADN através do protocolo “*ilustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit*”**

Para este protocolo foi extraído ADN duas vezes, a partir de quantidades de amostra diferentes: 25 mg e 50 mg. A devida quantidade de amostra homogeneizada foi pesada e colocada num tubo de reação de 1,5 mL. Para provocar a lise das células, foram adicionados 50 µL de Tampão de Lise Tipo 1 e 10 µL de *Proteínase K*. Após vortexar as amostras 15 segundos, estas foram incubadas, durante 1 hora a 56 °C. Após centrifugação das amostras, durante 10 segundos a 2 000 g, adicionou-se 5 µL de RNase A (20 mg/mL) e incubou-se as amostras, 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se à purificação do ADN extraído. Para tal, adicionou-se 500µL de Tampão de Lise Tipo 4, vortexaram-se as amostras durante 15 segundos e incubaram-se novamente, 10 minutos à temperatura ambiente. Após a junção de uma minicoluna *tissue & cells* a um tubo coletor, transferiram-se as amostras para o conjunto e centrifugaram-se, durante 1 minuto a 11 000 g; descartando-se o fluido retido no tubo. Para lavar o ADN, adicionou-se 500 µL de Tampão de Lise 4, centrifugou-se e descartou-se o fluido retido no tubo coletor. Adicionaram-se 500 µL de Tampão de Lavagem tipo 6 e centrifugaram-se as amostras, durante 3 minutos a 11 000

g, por forma a secar o ADN. O tubo coletor é descartado e a minicoluna *tissue & cells* é transferida para um novo tubo de reação de 1,5 mL. Adicionaram-se 200 µL de Tampão de Eluição tipo 5, previamente aquecido, e incubaram-se as amostras, 1 minuto à temperatura ambiente. Após centrifugar 1 minuto a 11 000 g, o fluido retido no tubo de reação contendo o ADN genómico purificado é armazenado a – 20°C, para posterior utilização.

#### **3.3.2.4 - Extração de ADN pelo Método de Wizard modificado**

O método de extração de Wizard foi aplicado segundo o protocolo descrito por Koppel *et al.* (2011).

Pesaram-se 200 mg de amostra homogeneizada e colocou-se num tubo de reação de 2 mL. Adicionaram-se 900 µL de Tampão de Extração, 100 µL de hidrocloreto de guanidina 5M e 40 µL de proteinase K. Após vortexar vigorosamente, as amostras foram deixadas a incubar, durante 1 hora a 60 °C com agitação. Depois de centrifugar as amostras, durante 10 minutos a 12 000 xg, foram adicionados 5 µL de RNase A num novo tubo de reação de 2 mL, para o qual se transferiu seguidamente 500 µL do sobrenadante, misturando tudo por inversão. Posteriormente, as amostras foram incubadas, durante 5 minutos a 60 °C, por forma a hidrolisar o ARN isolado. Foi então adicionado à mistura 1 mL da Resina Wizard (agitada previamente à utilização) e misturou-se tudo novamente por inversão. Após a união de uma seringa de 2 mL a uma minicoluna Wizard, a mistura anterior é colocada na seringa e ejetada através do movimento do êmbolo. A Minicoluna contendo a mistura de ADN e Resina foi lavada com 1 mL de Solução de Lavagem de Coluna e seguidamente com 2 mL de isopropanol 80%. Após remoção da seringa, a minicoluna foi inserida num novo tubo de reação de 1,5 mL e centrifugada, durante 2 minutos a 10,000 x g. A minicoluna foi colocada num novo tubo de reação de 1,5 mL e o ADN presente na mesma eluído com 50 µL de TE 0.5X (previamente aquecido a 60 °C). Após incubação, durante 1 minuto à temperatura ambiente, procedeu-se a nova centrifugação, durante 2 minutos a 10,000 x g. A minicoluna foi descartada e as soluções de ADN armazenadas a -20 °C, para posterior utilização.

#### **3.4 - Quantificação e Análise da Pureza do ADN extraído**

Numa primeira fase, por forma a garantir a existência de material genético, nas soluções resultantes dos processos de extração, e avaliar a sua pureza, dois métodos de quantificação de ácidos nucleicos foram empregues: fluorimetria (Qubit<sup>TM</sup>) e espectrofotometria (Nanodrop<sup>TM</sup> 1000). A pureza do ADN somente pode ser avaliada pelo método de espectrofotometria (Nanodrop<sup>TM</sup> 1000).

Os valores das concentrações de ADN obtidas foram ajustados por comparação à quantificação de ADN de uma amostra controlo de concentração 10 ng/μL (9947A DNA, Promega).

#### **3.4.1 - Quantificação por Fluorimetria (Qubit™)**

De modo a quantificar as amostras por fluorimetria, foi utilizado o fluorómetro Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) e o *kit* Quant-iT™ BR assay (Invitrogen).

Numa fase inicial, procedemos à preparação de uma solução de Trabalho Quant-iT, constituída por 199 μL de *Tampão Quant-iT™* (Invitrogen) e 1 μL de *Reagente Quant-iT™* (Invitrogen), por cada amostra em estudo. Seguidamente, preparam-se os *Standards* de calibração (S1 e S2), por adição de 10 μL da solução Standard do *Kit* a 190 μL da Solução de Trabalho previamente preparada. Da mesma forma, preparam-se as amostras a quantificar, por adição de 10 μL de cada amostra a 190 μL da Solução de Trabalho. Os tubos contendo as misturas, foram vortexados durante 3 segundos e incubados durante 2 minutos, à temperatura ambiente. Após ligar o Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), seleccionámos a opção “dsDNA BR assay Kit” (para 2-1000 ng de DNA) e uma vez escolhida a opção “Run new calibration”, inseriram-se os Standards 1 e 2, de cada vez, de forma a calibrar o aparelho. De seguida as amostras a quantificar foram inseridas, individualmente, para realizar a leitura fluorométrica. Devemos ter em conta que, o valor apresentado no ecrã corresponde à concentração de ácidos nucleicos no tubo de reação, pelo que, para obter a concentração da amostra, temos que multiplicar o valor apresentado pelo fator de diluição (Volume Total/Volume Utilizado de Amostra).

Usualmente, são aceites valores entre 1,8 e 1,9, para considerar o ADN resultante de uma extração de elevada pureza (Nguyen *et al.*, 2009).

#### **3.4.2 - Quantificação e avaliação da pureza do ADN (Nanodrop™ 1000)**

Na quantificação por espectrofotometria, utilizou-se o espectrofotómetro *NanoDrop™1000* (Thermo Scientific), o qual permite a medição da concentração de uma amostra com elevada precisão. A tecnologia de retenção da amostra, baseada na tensão superficial, elimina a necessidade de utilizar cuvetes, simplificando esta etapa de análise. Além disso, o espectrofotómetro *Nanodrop™ 1000* (Thermo Scientific) permite medir amostras altamente concentradas, sem diluição.

1 μL de amostra é pipetado sobre a extremidade de um cabo de fibra ótica. Um segundo cabo de fibra ótica é colocado em contacto com a amostra de líquido fazendo com que este preencha o espaço entre as extremidades da fibra óptica. Uma lâmpada de xénon pulsado fornece um *flash* da

fonte de luz e um espectrómetro de utilização de um sensor CCD linear é utilizada para analisar a luz depois de passar através da amostra. O instrumento é controlado por um *software* que possibilita o registo dos dados num arquivo no computador.

Antes da análise das amostras, o instrumento deve ser sujeito a calibração, fazendo para isso a mediação do tampão/água, consoante o protocolo, onde se encontra diluído o ADN. A leitura da concentração e pureza das amostras é depois efetuada de forma contínua, sendo somente necessário limpar a extremidade onde estas são colocadas.

A razão de absorvância 260/280 permite verificar a contaminação por proteínas ao passo que a razão de absorvância 260/230 permite verificar contaminação por compostos como o hidróclorato de guanidina, fenol (Psifidi *et al.*, 2015) ou EDTA, utilizados na extração de ADN (Nanodrop, Technical Support Bulletin, 2007)

### **3.5 - Amplificação de ADN**

Consoante a finalidade das análises, as reações de amplificação das amostras de ADN, com os diferentes *kits* de amplificação, foram realizadas no termociclador *CFX96™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad), sendo os dados analisados pelo *software Bio-Rad CFX Manager 2.0* (Bio-Rad), ou no termociclador *iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad).

#### **3.5.1 - Amplificação das amostras com o kit de amplificação *Taq PCR Core kit (Qiagen)*.**

Foi preparada previamente uma solução *MasterMix* com os componentes e respetivos volumes, por amostra a amplificar, indicados na tabela 7. Após distribuição de 24 µL de *MasterMix* por tubo de reação, foi adicionado 1µL de ADN das respetivas amostras ou controlos, perfazendo um volume total de mistura de amplificação de 25 µL.

A reação de amplificação decorreu no *iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) seguindo o protocolo especificado na tabela 8.



**Tabela 7** - Componentes constituintes da reação de amplificação com *Taq PCR Core Kit*.

Componentes da Master Mix	Volume (μL) por amostra
Água Ultra Pura	18,8
PCR Buffer 10x	2,5
dNTP's	0,5
<i>Primer Forward</i>	1
<i>Primer Reverse</i>	1
<i>Taq DNA Polymerase</i>	0,2
ADN	1

**Tabela 8** - Condições de amplificação para o kit *Taq PCR Core Kit*.

T (°C)	Tempo	Ciclos
94	3 minutos	1
94	30 segundos	45
65	1 minuto	
72	45 segundos	
72	10 minutos	
4	∞	

### 3.5.2 – *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (Bio-Rad)*

As amplificações por *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* foram realizadas num volume total de 20μL, contendo os componentes e respetivos volumes indicados na tabela 9.

A amplificação das amostras decorreu, posteriormente, segundo as condições descritas na tabela 10, no sistema *CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad).

**Tabela 9** - Componentes constituintes da reação de PCR com *SsoFast™ EvaGreen® Supermix*.

Componente	Volume (µL)
<i>SsoFast EvaGreen Supermix IX</i>	10
H <sub>2</sub> O	7,8
<i>Primer Forward</i>	0,6
<i>Primer Reverse</i>	0,6
AND	1

**Tabela 10** - Condições de amplificação para o *SsoFast EvaGreen® Supermix*.

T (°C)	Tempo	Ciclos
98	2 minutos	1
98	5 segundos	40
65	15 segundos	
95	1 minuto	
50	5 minutos	

Para obtenção da curva de *melting*, a temperatura foi aumentada em 0,2 °C de 65 °C a 95 °C.

Consoante o objetivo delineado, estes dois protocolos de amplificação foram realizados com um ou dois dos pares de *primers* descritos na tabela 11.

**Tabela 11** - *Primers* utilizados na identificação de *Sus scrofa* (porco) e como controlo da amplificação (18S rRNA).

Espécie/Gene Alvo	Primer	Sequência	Tamanho do Fragmento (pb)	Fonte
<i>Sus scrofa</i> ( <i>Cytb</i> )	<i>Pork Forward</i>	ATG AAA CAT TGG AGT AGT CCT ACT ATT TAC C	149	Dooley <i>et al.</i> (2004)
	<i>Pork Reverse</i>	CTA CGA GGT CTG TTC CGA TAT AAG G		
<i>Eukaryotic</i> (18S rRNA)	<i>Euk Forward</i>	TCT GCC CTATCA ACT TTC GAT GG	140	Fajardo <i>et al.</i> (2008a)
	<i>Euk Reverse</i>	TAA TTT GCG CGC CTG CTG		

### 3.5.3 - *VERYfinder Swine Semi-Q Assay* (Generon)

Este *kit* permite detetar, num ensaio em tempo real, uma sequência alvo específica de ADN de suíno (sequência mitocondrial com 104 pb) através da utilização de uma sonda marcada com fluorescência (FAM). Um canal de deteção adicional permite a captação de sinal na frequência de HEX, utilizada para detetar o Controlo Interno de Amplificação, que possibilita a exclusão de falsos negativos, resultante da inibição da PCR. O *kit Veryfinder Swine Semi-Q Assay* (Generon) apresenta dois controlos internos positivos, um para carne crua e outro para carne cozinhada (20 minutos a 121°C).

Na preparação da *VERYfinderWorking Mastermix*, adicionaram-se 750µL de *GENERase ULTRA PLUS Mastermix* (Generon) a 150 µL de *VERYfinder OLIGOMix* (Generon), vortexando posteriormente a mistura. Aquando da preparação das misturas de amplificação, a 18 µL de *VERYfinder Working Mastermix* adicionaram-se 12 µL de cada amostra ou controlo, perfazendo um volume final de 30 µL. A amplificação decorreu segundo o protocolo proposto pelo *kit* (Tabela 12), no sistema *CFX96™ Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad), sendo a fluorescência medida no final de cada ciclo.

**Tabela 12** - Protocolo de Amplificação do *kit Veryfinder Swine Semi-Q Assay* (Generon)

<b>Etapas</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Ativação da Taq	95	3 minutos	1
Desnaturação do ADN	95	10 segundos	45
<i>Annealing</i> /Extensão	60	45 segundos	

### 3.5.4 - *VERYfinder Equine Semi-Q Assay* (Generon)

Este *kit* permite detetar, num ensaio em tempo real, uma sequência alvo específica de ADN de equino (sequência genómica com 95 pb) através da utilização de uma sonda marcada com fluorescência (FAM). Um canal de deteção adicional permite a captação de sinal na frequência de HEX, utilizada para detetar o Controlo de Interno de Amplificação, que possibilita a exclusão de falsos negativos, resultante da inibição da PCR. O *kit Veryfinder Equine Semi-Q Assay* (Generon) apresenta dois controlos internos positivos, um para carne crua e outro para carne cozinhada (20 minutos a 121°C).

Na preparação da *VERYfinderWorking Mastermix*, adicionaram-se 750µL de *GENERase ULTRA PLUS Mastermix* (Generon) a 150 µL de *VERYfinder OLIGOMix* (Generon), vortexando

posteriormente a mistura. Aquando da preparação das misturas de amplificação, a 18 µL de *VERYfinder Working Mastermix* adicionaram-se 12 µL de cada amostra ou controlo, perfazendo um volume final de 30 µL. A amplificação decorreu segundo o protocolo proposto pelo *kit* (Tabela 13), no sistema *CFX96™ Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad), sendo a fluorescência lida no final de cada ciclo.

**Tabela 13** - Protocolo de Amplificação do *Kit Veryfinder Equine Semi-Q Assay*

Etapa	T (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação da Taq	95	3 minutos	1
Desnaturação do ADN	95	10 segundos	45
<i>Annealing</i> /Extensão	60	45 segundos	

### 3.5.5 - *AllHorse* (Microsynth)

*AllHorse* é um *Kit* de amplificação *tetraplex* desenvolvido por Koppel *et al.* (2011). Este permite a deteção simultânea de porco (*Sus scrofa*), vaca (*Bos taurus*), cavalo (*Equus caballus*) e ovelha (*Ovis aries*), através da amplificação de sequências nucleotídicas genómicas, específicas de espécie, e da utilização de sondas fluorescentes (Tabela 14).

Como verificamos na tabela 14, a sonda respetiva de cada espécie encontra-se marcada com um fluoróforo particular. No caso concreto da espécie *Sus scrofa*, o marcador é JOE. Dado que este marcador não se encontra na lista de marcadores detetados pelo sistema de PCR utilizado, este foi substituído pelo marcador HEX, uma vez que apresenta um intervalo de emissão e absorção similar (Fluorogenic Probes & Primers for Real-Time qPCR, Biosearch® Technologies).

O *MasterMix Ready to Use* foi previamente preparado, segundo o protocolo descrito pelo *kit*. Ao tubo contendo os *primers* e sondas liofilizados foram adicionados 150 µL de água para PCR (*PCR Grade*) e incubou-se, durante 5 minutos a 60°C. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de *PerfeCTa® MultiPlex qPCR ToughMix®* (Quanta Bioscience), sendo depois armazenado a 4°C até posterior utilização.

O ensaio de qPCR foi realizado com uma solução total de 25 µL, contendo 20 µL de *MasterMix Ready to Use* (Quanta Bioscience) e 5 µL de amostra ou controlo, segundo o seguinte protocolo de amplificação: 95°C durante 3 minutos, 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 62°C durante 90 segundos, com a deteção de sinal fluorescente no final de cada ciclo. A amplificação decorreu no sistema *CFX96™ Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad).

**Tabela 14** - Descrição dos *primers* e sondas constituintes do *Kit AllHorse*. Adaptado de Koppel *et al.* (2011).

Primer/Sonda	Concentração Final (µM)	Sequência	Fragmento Amplificado	Nº Acc GenBank Marcação
<i>Vaca</i>				
Rd 1 F	0.2	GTA GGT GCA CAG TAC GTT CTG AAG	96 pb	Gene β-actina EH170825 ROX-BHQ2
Rd 1 R	0.2	GGC CAG ACT GGG CAC ATG		
Bos-ActiB_Rox	0.08	CGG CAC ACT CGG CTG TGT TCC TTG C		
<i>Porco</i>				
Sus_ACTB-F	0.2	GGA GTG TGT ATC CCG TAG GTG	103 pb	Gene β-actina DQ452569 JOE-BHQ1
Sus_ACTB-R	0.2	CTG GGG ACA TGC AGA GAG TG		
Sus1 TMP	0.08	TCT GAC GTG ACT CCC CGA CCT GG		
<i>Cavalo</i>				
EC-GHR1-F	0.2	CCA ACT TCA TCA TGG ACA ACG C	107 pb	Recetor da Hormona de Crescimento o AF392878 Cy5-BHQ2
EC-GHR1-R	0.2	GTT AAA GCT TGG CTC GAC ACG		
EC-GHR1-Cy5	0.08	AAG TGC ATC CCC GTG GCC CCT CA		
<i>Ovelha</i>				
OA-PRLR-F	0.2	CCA ACA TGC CTT TAA ACC CTC AA	88 pb	Recetor da Prolactina AF041979 Fam-BHQ1
OA-PRLR-R	0.2	GGA ACT GTA GCC TTC TGA CTC G		
OA-PRLRFam	0.08	TGC CTT TCC TTC CCC GCC AGT CTC		

### 3.6 - Eletroforese em gel de agarose (2%)

Os fragmentos de ADN obtidos na PCR foram avaliados após separação em gel de agarose.

Para tal, pesaram-se 2 g de *Agarose* (Lonza), à qual se adicionou 100 mL de *TBE 1X* (Lonza). A mistura foi aquecida no microondas até total dissolução da agarose. Posteriormente adicionaram-se ao gel 4 μL de *GelRed* (Biotium). A mistura foi depois vertida para uma moldeira equilibrada, contendo um pente com um número de poços similar ao número total de amostras amplificadas. Deixou-se polimerizar o gel, durante cerca de 20 minutos.

A tina de eletroforese foi depois preenchida com *TBE 1X*, onde se colocou posteriormente o gel solidificado, após remoção do pente.

Antes de carregar as amostras nos respetivos poços, estas foram preparadas da seguinte forma: adição de 1 μL de *6X Orange DNA Loading Dey* (Thermo Scientific) a 5 μL de solução de ADN

extraído e adição de 2  $\mu$ L de *Ready Ladder™, 50 pb DNA Marker* (Amresco) a 4  $\mu$ L de água Ultra Pura.

Depois de carregado o gel, com as amostras e o marcador molecular, coloca-se o gel a correr com uma corrente de 130 V e 400 A, durante 35 minutos.

Uma vez terminada a corrida, o gel foi observado no Gel Image system, Biodoc IT (UVP), sob luz UV.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 – Avaliação do ADN extraído das amostras de carne fresca

#### 4.1.1 - Análise da concentração e pureza do ADN extraído das amostras de carne frescas

Os resultados obtidos relativamente à concentração e pureza do ADN extraído das amostras de carne referentes às espécies em estudo, adquiridas no talho, encontram-se discriminados nas tabelas 15 a 18. Podemos observar que, para a extração de Fenol-Clorofórmio, as concentrações variaram entre 573,2 e 1014,2 ng/μL e que os valores da razão  $A_{260}/A_{280}$  se encontram entre 1,77 e 1,94, o que indica que os extratos apresentaram concentração e pureza elevadas (Tabela 15). Relativamente às amostras extraídas pelo método de CTAB, verificamos que podemos igualmente afirmar que os extratos apresentam pureza elevada, pois o valor da razão  $A_{260}/A_{280}$  variou entre 1,77 e 1,93 (Tabela 16). As concentrações de ADN variaram entre 16,2 ng/μL e 309,9 ng/μL, sendo estas mais baixas relativamente ao método de Fenol-Clorofórmio. Já com o protocolo de extração Wizard (Tabela 17), observamos que as amostras apresentaram um leque de pureza com valores da razão de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  situados entre 1,08 e 1,7, o que não vai de encontro aos valores ideais estabelecidos (1,8 – 1,9). As concentrações de ADN extraído variaram entre 14,8 ng/μL e 114,8 ng/μL. Por último, com o protocolo de extração da *illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit*, não se verificou ADN presente na maior parte das amostras, apresentando as restantes valores entre 0,4 ng/μL e 1,9 ng/μL. Já no que se refere aos valores de pureza destas mesmas amostras não foi possível obter, como podemos ver na tabela 18. Uma vez que este protocolo de extração envolve colunas, nas quais o ADN fica retido durante todo o processo de extração e purificação, a quantidade de amostra utilizada pode ter interferido com o processo de extração. Quer na extração de ADN a partir de 25 mg, quer na extração de ADN a partir de uma amostra de 50 mg, os resultados foram semelhantes. Este método não é assim adequado à extração de ADN a partir de amostras de carne.

A comparação entre o rendimento e a pureza, obtida pela razão  $A_{260}/A_{280}$ , dos quatro métodos de extração encontra-se compilada nos gráficos das figuras 23 e 24, respetivamente.

**Tabela 15** - Análise do ADN extraído das amostras pelo método Fenol-Clorofórmio.

Qubit			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Concentração em 10 µL (µg/mL)	
V1	6,8	140	
V2	>10	-	
P1	>10	-	
P2	>10	-	
C1	1,60	32,0	
C2	2,65	52,9	
O1	>10	-	
O2	>10	-	
Nanodrop			
Amostra	Concentração (ng/µL)	Pureza	
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
V1	589,2	1,77	1,36
V2	943,4	1,81	1,49
P1	611,9	1,87	1,63
P2	756,4	1,89	1,68
C1	573,2	1,83	1,09
C2	1014,2	1,84	0,96
O1	851,1	1,94	1,96
O2	921,4	1,90	1,74

**Tabela 16** - Análise do ADN extraído das amostras controlo pelo método de CTAB.

Qubit			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Concentração em 10 µL (µg/mL)	
V1	>10	-	
V2	3,33	66,6	
P1	1,43	28,5	
P2	2,47	49,3	
C1	5,0	100	
C2	1,96	39,1	
O1	0,926	18,5	
O2	0,718	14,4	
Nanodrop			
Amostra	Concentração (ng/µL)	Pureza	
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
V1	309,9	1,85	2,45
V2	71,6	1,87	2,58
P1	31,2	1,79	2,64
P2	55,6	1,86	2,61
C1	25,1	1,93	3,56
C2	62,6	1,88	2,84
O1	22,1	1,77	4,39
O2	16,2	1,84	9,48

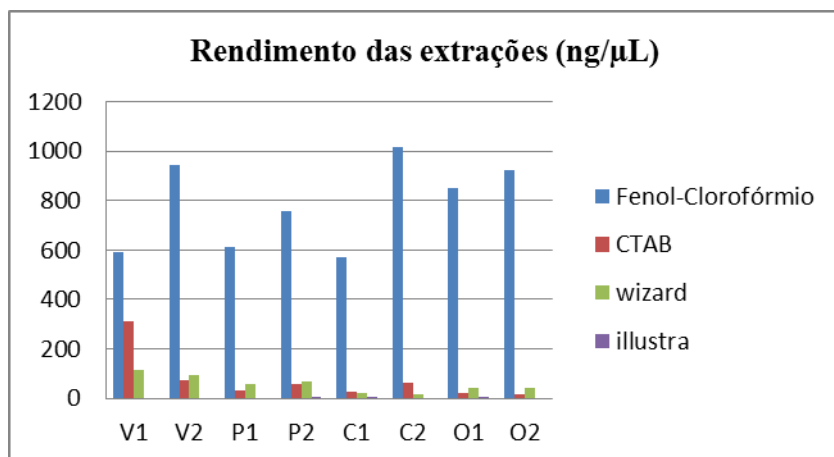


**Tabela 17** - Análise do ADN extraído das amostras controlo pelo método de Wizard.

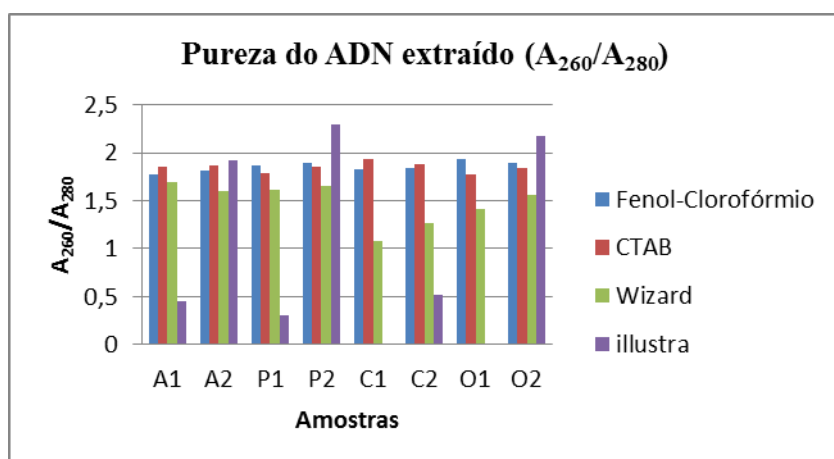
Qubit			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Concentração em 10 µL (µg/mL)	
V1	3,21	64,3	
V2	2,43	48,6	
P1	1,45	29,1	
P2	1,49	29,7	
C1	0,117	2,34	
C2	0,0698	1,40	
O1	0,870	17,4	
O2	0,503	10,1	
Nanodrop			
Amostra	Concentração (ng/µL)	Pureza	
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
V1	114,8	1,70	0,85
V2	92,5	1,60	0,64
P1	54,9	1,62	0,59
P2	69,2	1,65	0,73
C1	20,7	1,08	0,27
C2	14,8	1,27	0,26
O1	40,5	1,42	0,41
O2	39,3	1,56	0,65

**Tabela 18** - Análise do ADN extraído das amostras controlo pelo protocolo *illustra*.

Qubit			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Concentração em 10 µL (µg/mL)	
V1	<0,010	-	
V2	<0,010	-	
P1	<0,010	-	
P2	<0,010	-	
C1	<0,010	-	
C2	<0,010	-	
O1	<0,010	-	
O2	<0,010	-	
Nanodrop			
Amostra	Concentração (ng/µL)	Pureza	
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
V1	0	-	-
V2	0	-	-
P1	0	-	-
P2	1,9	-	-
C1	0,4	-	-
C2	-	-	-
O1	1,3	-	-
O2	0	-	-



**Figura 23** - Gráfico comparativo do rendimento das extrações pelos diferentes métodos.

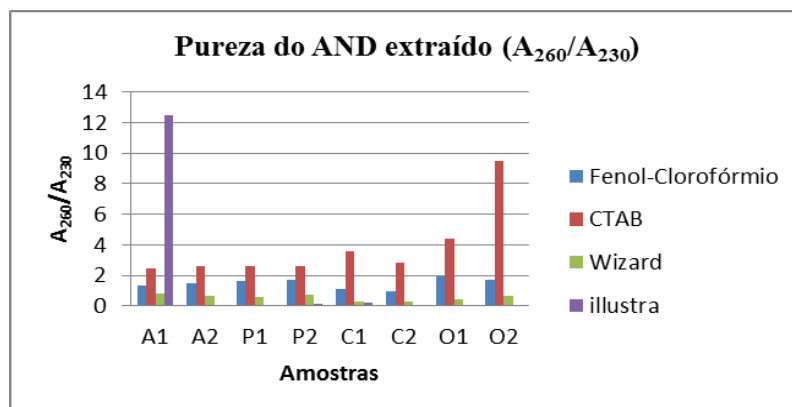


**Figura 24** - Gráfico comparativo da pureza do ADN ( $A_{260}/A_{280}$ ) extraído pelos diferentes métodos de extração.

Verificamos que o método de extração com maior rendimento de ADN extraído foi o método de fenol-clorofórmio. Em termos de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) os métodos de Fenol-Clorofórmio e CTAB destacaram-se dos restantes.

Outro aspeto avaliado, que permite extrapolar conclusões acerca do método de extração mais adequado, é a razão de absorvância  $A_{260}/A_{230}$  (Figura 25).

Os valores da razão  $A_{260}/A_{230}$  devem situar-se no intervalo 2.0-2.2 (Nanodrop, Technical Support Bulletin, 2007), pelo que, através da observação do gráfico na figura 25, concluímos que o método de CTAB modificado se destacou relativamente ao método de Fenol-Clorofórmio.

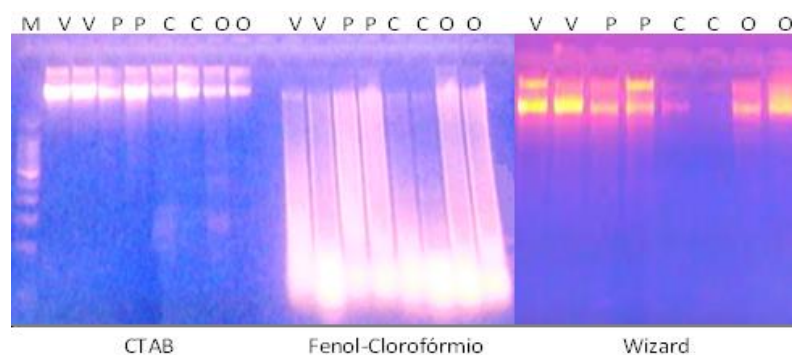


**Figura 25** - Gráfico comparativo da pureza do ADN ( $A_{260}/A_{230}$ ) extraído pelos diferentes métodos de extração.

#### 4.1.2 - Avaliação da integridade do ADN extraído das amostras de carne fresca

Dados os valores apresentados na extração pelo método Wizard, as amostras de ADN extraído por este protocolo foram, a partir deste ponto, excluídas.

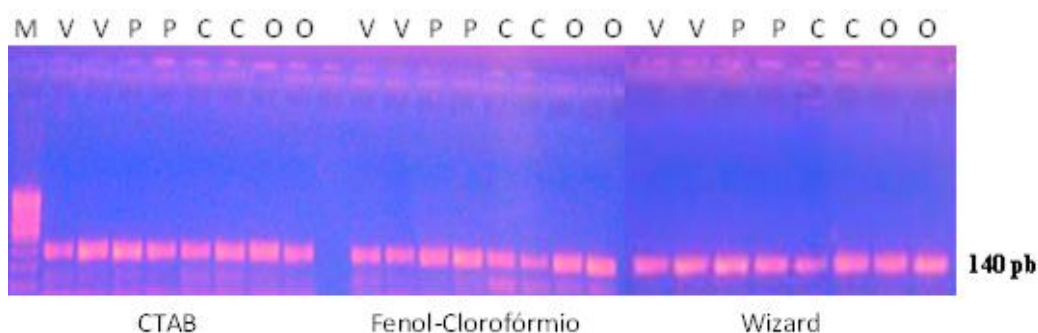
O estado de fragmentação do ADN extraído foi posteriormente avaliado pelo tamanho dos fragmentos e proporção de arrastamento obtidos em gel de agarose. Como podemos ver na figura 26, o método de CTAB e o método de Wizard produziram ADN de elevado peso molecular com reduzido arrastamento, o que evidencia a sua integridade. Já o método de Fenol-Clorofórmio apresenta bandas ténues, de elevado peso molecular, e um grande arrastamento, o que reflete uma maior degradação do ADN. As amostras W5 e W6 revelam menor fluorescência, o que vai de encontro aos valores presentes na tabela 17, onde verificamos que são as amostras com menor concentração de ADN extraído.



**Figura 26** - Comparação da fragmentação do ADN extraído pelos métodos de CTAB, Fenol-Clorofórmio e Wizard: M (marcador molecular 100pb); V (amostras *Bos taurus*); P (amostras *Sus scrofa*); C (amostras *Equus caballus*); O (amostras *Ovis aries*).

#### 4.1.3 - Avaliação da viabilidade do ADN, obtido pelos diferentes protocolos de extração, para amplificação por PCR convencional com o *kit* de amplificação *Core kit* e os *primers* 18S rARN

Por forma a avaliar a viabilidade do ADN extraído para amplificação, duas réplicas de ADN de cada espécie em estudo diluídas de 2 ng/μL, extraídas pelos métodos de CTAB, Fenol-Clorofórmio e Wizard forma amplificadas segundo o protocolo *Core kit* utilizando os *primers* universais 18S rRNA (*Eukariotyc*).



**Figura 27** - Avaliação da viabilidade do ADN extraído pelos métodos de CTAB, Fenol-Clorofórmio e Wizard para amplificação por PCR: M (marcador molecular 50pb); V (amostras *Bos taurus*); P (amostras *Sus scrofa*); C (amostras *Equus caballus*); O (amostras *Ovis aries*).

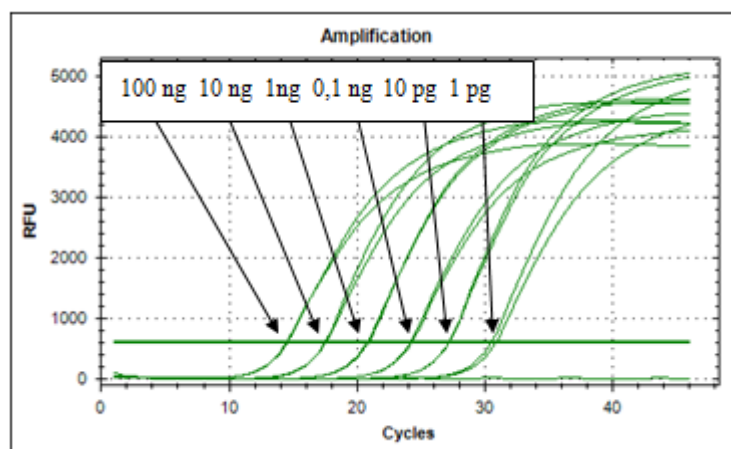
Verificamos que foi possível amplificar todas as amostras, como podemos ver pelo gel de agarose na figura 27, pela presença de uma banda de 140 pb.

Pela avaliação conjunta de todos os métodos de extração, verificamos que o método de Wizard foi o que mostrou menor eficiência, não sendo, por isso, apropriado para a extração de ADN de amostras de carne frescas. Este facto vai contra resultados anteriormente publicados, em que o protocolo de Wizard permitiu obter valores de concentração de ADN consideráveis, quer a partir de amostras vegetais quer de produtos cárneos (Mafra *et al.*, 2008; Datukishvili *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2014). No entanto, valores semelhantes foram obtidos por Stefanova *et al.* (2013), com o *kit* Wizard® *Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega), tendo a inviabilidade do processo sido atribuída ao elevado teor lipídico das amostras. Já o ADN obtido com o protocolo de extração Fenol-Clorofórmio, ainda que tenha apresentado elevados valores de concentração e pureza, revelou uma extensa degradação do ADN quando submetido a eletroforese em gel de agarose (Figura 26). Os valores obtidos com o protocolo de CTAB modificado foram concordantes com os resultados obtidos por Stefanova *et al.* (2013), realçando a adequação deste método para a extração de ADN de amostras de carne.

#### 4.2 – Determinação da sensibilidade e especificidade do sistema de amplificação composto pelo kit de amplificação *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* e os primers *Pork*, específicos de *Sus scrofa*

A detecção de porco por PCR em tempo real foi realizada com o *kit* de amplificação *Sso Fast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* e os primers *Pork-F/Pork-R*. A especificidade foi avaliada através das curvas de *melting* obtidas em cada ensaio, sendo que os produtos formados deveriam apresentar a mesma temperatura de *melting*, de maneira a comprovar que a amplificação resultava de um único tipo de fragmento, tratando-se por isso de uma reação específica.

A sensibilidade da PCR (limite de detecção absoluto) em tempo real foi determinada pela amplificação de diluições em série (10X) (Figura 28), a partir de uma solução de concentração 50ng/μL de um extrato de ADN de porco extraído pelo método de CTAB. As curvas de amplificação dos padrões mostraram que foi possível detetar porco até um nível de 0,001 ng (1pg). A média dos valores de Ct para cada diluição encontra-se na tabela 19. Verificamos que entre cada diluição existe uma diferença aproximada de 3 Ct, o que contribuiu par a linearidade da curva de calibração (Figura 29).

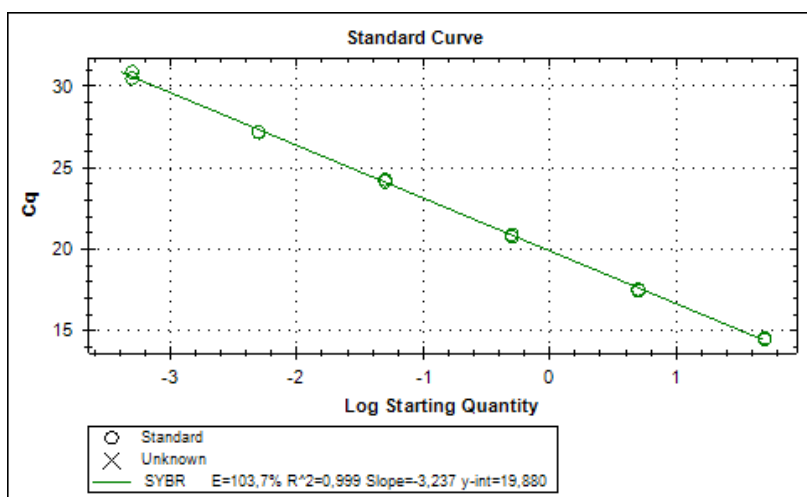


**Figura 28** - Curva de amplificação da diluição seriada do extrato de porco, amplificada por PCR em tempo real com *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix*, usando os primers *Pork-F/Pork-R* específicos para a porco.

**Tabela 19** - Resultados obtidos para a determinação do LOD absoluto por PCR em tempo real de ADN de porco (Ct – média do número de ciclos; SD<sup>2</sup> – desvio padrão).

Diluição	Ct $\pm$ SD <sup>2</sup>
100	14,48 $\pm$ 0,06
10	17,49 $\pm$ 0,05
1	20,82 $\pm$ 0,11
0,1	24,19 $\pm$ 0,08
0,01	27,16 $\pm$ 0,02
0,001	30,66 $\pm$ 0,27

A curva de calibração obtida a partir da amplificação dos extratos de porco diluídos seriadamente mostrou que a eficiência da PCR foi muito próxima do valor ideal de 100% (103,7%), correspondente a um declive de -3,237 e todos os dados revelaram uma elevada correlação ( $R^2=0,999$ ) (Figura 29). O coeficiente de correlação bem como o declive e a eficiência da PCR vão de encontro aos valores recomendados pela bibliografia (Introduction to Quantitative PCR, 2012). Assim, os parâmetros obtidos mostraram a adequação da técnica de PCR em tempo real para medições quantitativas.

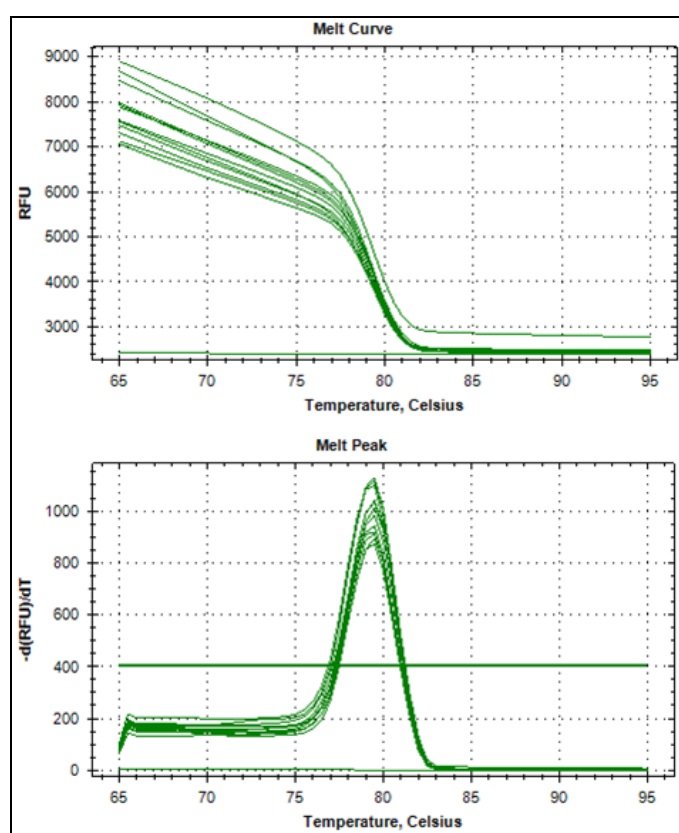


**Figura 29** - Curva de calibração da diluição seriada do extracto de porco, amplificada por PCR em Tempo Real com *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix*, usando os *primers* Pork-F/Pork-R, específicos para a porco.

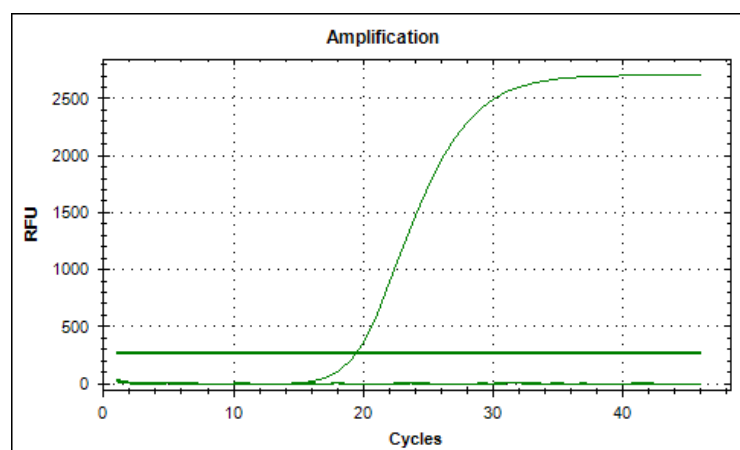
De forma a verificar a especificidade dos produtos amplificados foi efetuada uma análise da curva de *melting* (Figura 30), na qual verificamos que todos os produtos apresentam a mesma temperatura de *melting* de 79,5 °C. Além disso não se verifica a formação de dímeros de *primers* ou outros artefactos de amplificação.

O sistema de amplificação foi posteriormente testado com as outras espécies em estudo: *Bos taurus* (vaca); *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha), por forma comprovar a inexistência de reatividade cruzada entre os *primers* e estas espécies. Para tal, foram amplificadas com o sistema de amplificação *Sso Fast<sup>TM</sup> EvaGreen® Supermix* e os *primers Pork* uma amostra da extração de vaca, uma de ovelha e uma de cavalo, diluídas a 2 ng/μL. Por forma a excluir falsos negativos e falsos positivos, foram igualmente amplificadas, uma amostra de porco (controlo positivo) e uma amostra contendo água ultrapura (controlo negativo).

Como verificamos na figura 31, somente o controlo positivo para *Sus scrofa* amplificou, ao ciclo19,43.



**Figura 30** - Curva e picos de *melting* da diluição seriada do extrato de porco, amplificada por PCR em tempo real com *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen® Supermix*, usando os *primers Pork-F/Pork-R*, específicos para a porco.



**Figura 31** - Amplificação das amostras de *Bos taurus*, *Equus caballus* e *Ovis aries*, com o kit SsoTM Fast EvaGreen® e os *primers* Pork, na diluição de 2 ng/μL e de um controlo positivo da espécie *Sus Scrofa*. Somente o controlo positivo amplificou.

#### 4.3 – Determinação da sensibilidade do sistema de amplificação específico de *Sus scrofa* integrante do kit *Tetraplex AllHorse*

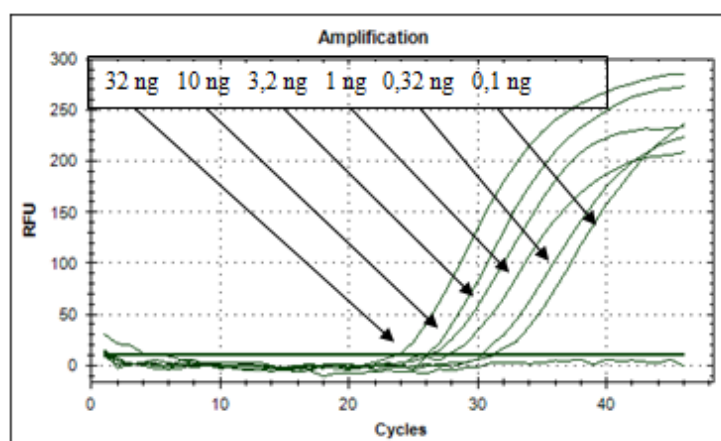
Uma vez que este sistema de amplificação engloba *primers* e sondas específicas para quatro espécies diferentes, o protocolo de amplificação foi optimizado, tendo-se verificado que a Temperatura de *Annealing* óptima era de 62 °C.

A sensibilidade da PCR (limite de detecção absoluto) em tempo real para o sistema de amplificação de *Sus scrofa* (porco), integrante do *kit* de amplificação *tetraplex AllHorse*, foi determinada pela amplificação de misturas de ADN, obtidas pela junção de extracções das diferentes espécies (Tabela 20), após estas terem sido sujeitas a diluições em série semi-logarítmicas (Figura 32), a partir de uma solução de concentração 20 ng/μL dos extractos de ADN extraído pelo método de CTAB. As curvas de amplificação dos padrões mostraram que foi possível detectar porco até um nível de 0,1 ng (0,1%) no tubo de reacção da mistura 4.



**Tabela 20** – Misturas *standard* preparadas a partir das diluições em série semi-logarítmicas para o *kit AllHorse* contendo desde 32 a 0,1 ng de ADN de amostra das diferentes espécies, por 5 µL de volume de reação. Adaptado de Koppel *et al.* (2011).

Nº do Tubo	Porco ( <i>Sus scrofa</i> )	Cavalo ( <i>Equus caballus</i> )	Ovelha ( <i>Ovis aries</i> )	Vaca ( <i>Bos taurus</i> )
1	3,2 ng	32 ng	0,32 ng	0,1 ng
2	1 ng	10 ng	0,1 ng	32 ng
3	0,32 ng	3,2 ng	32 ng	10 ng
4	0,1 ng	1 ng	10 ng	3,2 ng
5	32 ng	0,32 ng	3,2 ng	1 ng
6	10 ng	0,1 ng	1 ng	0,32 ng

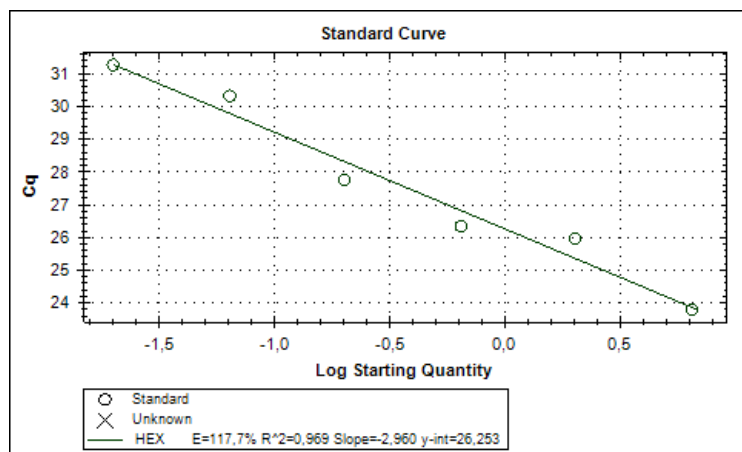


**Figura 32** - Curvas de amplificação da diluição seriada do extracto de porco, amplificada por PCR em Tempo Real com o *kit tetraplex AllHorse* com *primers* e sondas específicos para *Sus scrofa* (porco), *Bos taurus* (vaca), *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha).

A curva de calibração obtida a partir da amplificação dos extractos de porco diluídos seriadamente mostrou que a eficiência da PCR foi de 117,7%, correspondente a um declive de -2,969 e todos os dados revelaram uma correlação de  $R^2=0,969$  (Figura 33).

Ainda que a curva padrão apresente linearidade, o coeficiente de correlação bem como o declive e a eficiência da PCR, calculada através dos valores da curva de calibração, apresentam valores que não vão inteiramente de encontro aos valores estipulados pela literatura (Introduction to Quantitative PCR), o que não permite extrapolar a metodologia para posteriores análises quantitativas de *Sus scrofa*. No entanto, a análise foi feita com base num reduzido número de réplicas e repetições de amplificação, o que não segue os pré-requisitos exigidos nas linhas de

orientação MIQE de Bustin *et al.* (2009), pelo que posteriores experiências considerando um número mais elevado de amostras amplificadas seriam necessárias.

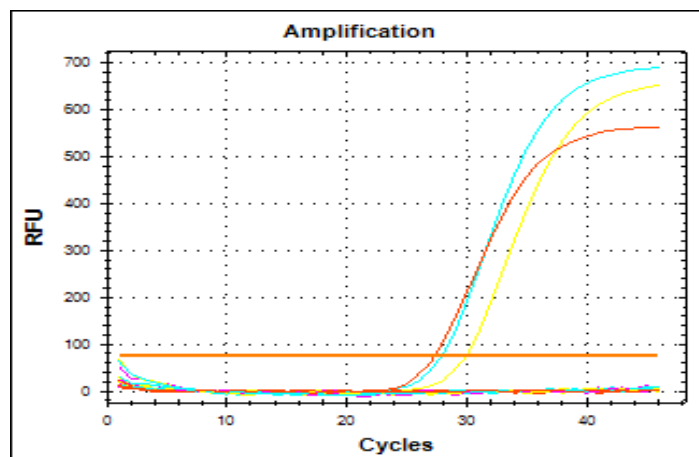


**Figura 33** - Curva de calibração da diluição seriada do extracto de porco, amplificada por PCR em tempo real com o *kit* tetraplex Allorse, com *primers* e sondas específicas para *Sus scrofa* (porco), *Bos taurus* (vaca), *Equus caballus* (cavalo) e *Ovis aries* (ovelha).

#### 4.4 - Determinação da especificidade dos sistemas de amplificação integrantes do *kit* Tetraplex AllHorse e avaliação da *performance* da qPCR para amplificação do ADN obtido pelos diferentes métodos de extração

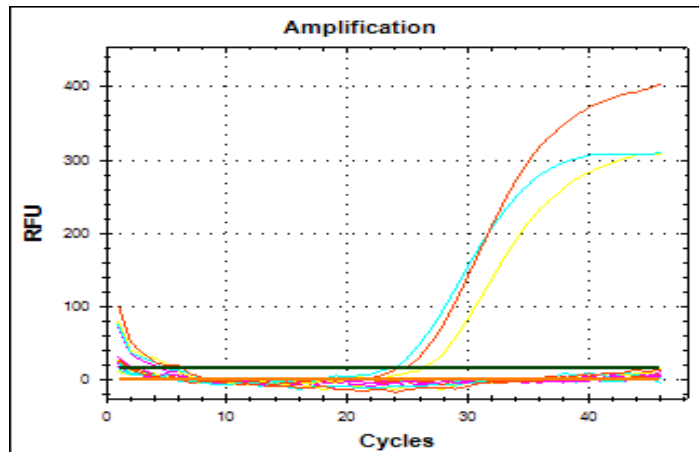
Seguidamente, as amostras de ADN das quatro espécies em estudo extraídas pelos protocolos CTAB, Fenol-Clorofórmio e Wizard foram amplificadas com o *kit* tetraplex AllHorse, por forma a avaliar a especificidade de cada sistema de amplificação e identificar possíveis casos de contaminação. De maneira a tornar a comparação mais eficiente, todas as amostras foram diluídas à concentração final de 2 ng/μL.

Na figura 34 verificamos que o sistema de amplificação específico para *Bos taurus* não detetou qualquer outra das espécies em estudo. Além disso, o ADN extraído pelo protocolo de Wizard apresenta o valor de Ct mais baixo de 27,37, seguindo-se o método de CTAB, apresentando um valor de Ct de 27,97 e, por fim, o método de Fenol-Clorofórmio com um valor de Ct de 30,05.



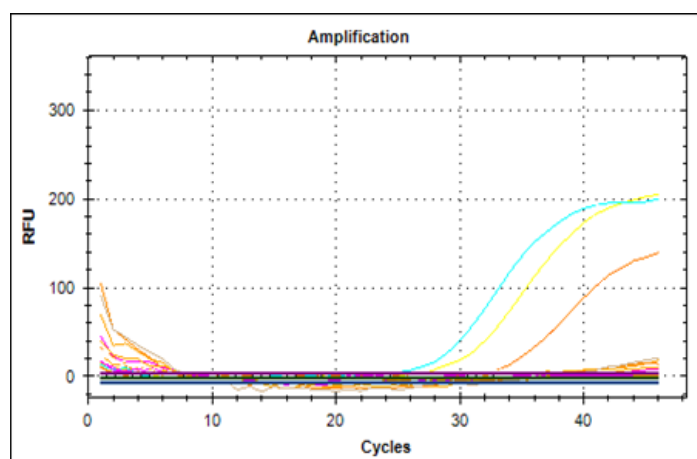
**Figura 34** - Amplificação com o kit AllHorse, do ADN extraído da amostra de vaca (*Bos taurus*) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).

No que concerne a espécie *Sus scrofa* (porco) verificamos na figura 35 que o sistema de amplificação específico para suíno não detetou qualquer outra das espécies testadas. Quanto aos protocolos de extração, observamos que o ADN extraído pelo protocolo de CTAB apresenta o valor de  $C_t$  mais baixo de 23,93, seguindo-se o protocolo de Wizard, apresentando um valor de  $C_t$  de 24,52 e, por fim, o método de Fenol-Clorofórmio com um valor de  $C_t$  de 26,35.



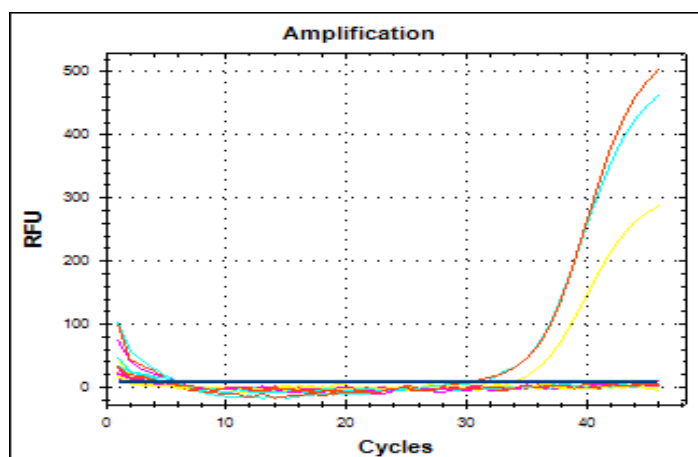
**Figura 35** - Amplificação com o kit AllHorse do ADN extraído da amostra de porco (*Sus scrofa*) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).

Para a espécie *Equus caballus* (cavalo), verificamos na figura 36 que o ADN extraído pelo protocolo de CTAB apresenta o valor de  $C_t$  mais baixo de 24,53, seguindo-se o protocolo de Wizard, apresentando um valor de  $C_t$  de 27,35 e, por fim, o método de Fenol-Clorofórmio com um valor de  $C_t$  de 32,33. Também o sistema de amplificação específico para cavalo não apresentou reacção cruzada com nenhuma das outras espécies em estudo.



**Figura 36** - Amplificação com o kit AllHorse do ADN extraído da amostra de cavalo (*Equus caballus*) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).

Considerando a espécie *Ovis aries* (ovelha), verificamos na figura 37 que o ADN extraído pelo protocolo de Wizard apresenta o valor de Ct mais baixo de 30,15, seguindo-se o protocolo de CTAB, apresentando um valor de Ct de 31,10 e, por fim, o método de Fenol-Clorofórmio com um valor de Ct de 33,83. Da mesma maneira, este sistema o sistema de amplificação para *Ovis aries* integrante do kit AllHorse mostrou ser específico para ovelha.



**Figura 37** - Amplificação com o kit AllHorse do ADN extraído da amostra de ovelha (*Ovis aries*) pelos protocolos CTAB (azul), Wizard (laranja) e Fenol-Clorofórmio (amarelo).

Pela avaliação das curvas de amplificação quanto ao nível de fluorescência e dos respectivos valores de Ct, verificamos que o método de extração por Fenol-Clorofórmio é o menos adequado para a extração de ADN das amostras. Já a amplificação de amostras extraídas pelo método de CTAB foram as que apresentam valores de fluorescência mais significativos. Após esta análise

adicional, concluímos uma vez mais que o método que se mostrou mais adaptado à extração de ADN em amostras de carne frescas foi o método de CTAB.

Verificámos ainda que os quatro sistemas de amplificação que compõem o *kit tetraplex AllHorse* apresentam especificidade para uma espécie em particular, não se tendo verificado reatividade cruzada entre os mesmos e as outras espécies em estudo.

Ao avaliar as diferentes curvas de amplificação verificamos, no entanto, que existem diferenças significativas entre os níveis de fluorescência e os valores de Ct detetados para cada espécie. Tratando-se de um sistema de amplificação multiplex, este é composto por quatro pares de *primers* e quatro sondas diferentes, todos com diferentes temperaturas de *annealing*. Como é utilizada uma temperatura de *annealing* comum, ainda que optimizada, os diferentes *primers* e sondas vão apresentar eficiências distintas aquando da reacção de amplificação.

As amostras de cada espécie extraídas a partir do protocolo de CTAB modificado e diluídas à concentração de 2 ng/μL foram a partir daqui utilizadas como controlo positivo na análise qualitativa de amostras comerciais.

#### **4.5 – Avaliação do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais**

##### **4.5.1 - Análise da concentração e pureza do ADN extraído de 4 amostras de hambúrgueres comerciais**

Uma vez extraído segundo o protocolo de CTAB modificado (Stefanova *et al.*, 2013), o ADN foi posteriormente quantificado por fluorimetria e espectrofotometria e a sua pureza foi igualmente avaliada através do valor das razões de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ .

Verificamos que a concentração do ADN extraído é relativamente mais baixa comparativamente às amostras controlo (Tabela 21), o que se justifica pelo facto de estas amostras terem sido sujeitas a diferentes métodos de processamento, entre os quais, exposição a elevadas temperaturas e pressões. No entanto, no que concerne aos níveis de pureza do ADN extraído, os valores da razão  $A_{260}/A_{280}$ , variaram entre 1,77 e 1,90, pelo que podemos concluir que o ADN extraído apresenta elevada pureza. Ainda que os valores referentes à razão  $A_{260}/A_{230}$  não se situem no intervalo 2.0 – 2.2, são todos superiores a 2.0 (Tabela 21), o que indica que não se encontram presentes contaminantes resultantes dos reagentes utilizados no processo de extração.

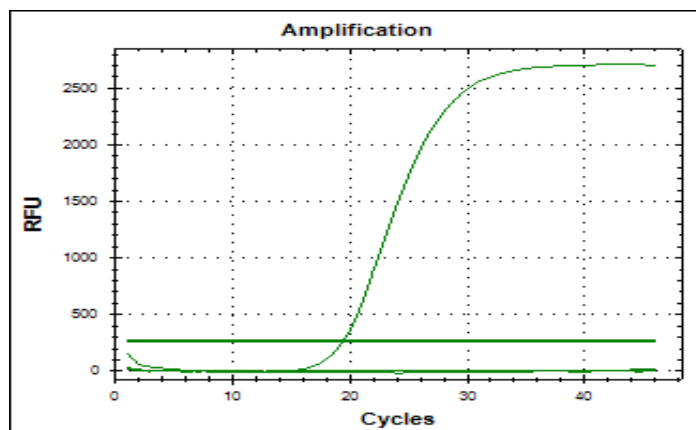
**Tabela 21** – Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais.

Qubit			
Amostra	Concentração (µg/mL)	Concentração em 10 µL (µg/mL)	
A1	1,31	26,1	
A1	1,27	25,3	
A2	1,89	37,8	
A2	1,77	35,3	
A3	1,27	25,3	
A3	2,20	44	
A4	2,97	58,3	
A4	2,63	52,6	
Nanodrop			
Amostra	Concentração (ng/µL)	Pureza	
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
A1	38,4	1,77	3,03
A1	35,3	1,90	3,10
A2	54,6	1,88	2,78
A2	49,3	1,90	2,77
A3	33,1	1,82	3,14
A3	55,1	1,83	3,01
A4	76,7	1,89	2,73
A4	91,5	1,82	2,64

A partir das concentrações obtidas pela quantificação realizada por espectrofotometria, as amostras foram diluídas para uma concentração final de 2 ng/µL, por adição de água ultrapura.

#### 4.5.2 - Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais, com o *kit* de amplificação *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* e os *primers* específicos para *Sus scrofa*

O sistema de amplificação *Kit SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* com os *primers* específicos de *Sus scrofa*, anteriormente optimizado, foi aplicado ao ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais, por forma a analisar as mesmas para a presença da espécie *Sus scrofa*. As amostras foram amplificadas na diluição de 2 ng/µL juntamente com um controlo negativo e um controlo positivo para *Sus scrofa*. Na figura 38 verificamos que somente o controlo positivo para porco amplificou aos 19,43 ciclos.

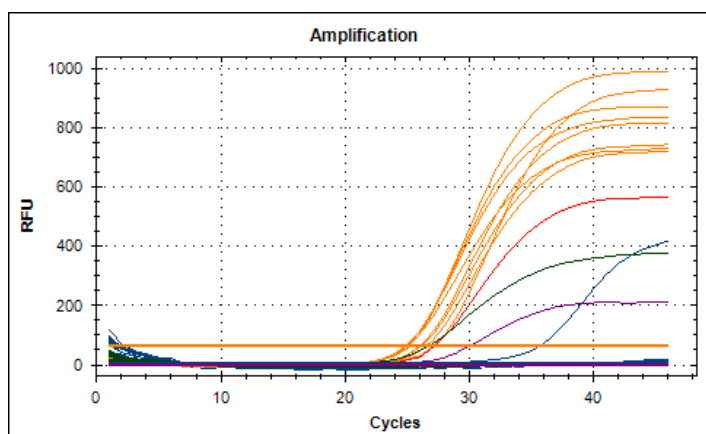


**Figura 38** - Amplificação das amostras dos hambúrgueres comerciais com o sistema de amplificação *SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* com os primers específicos para *Sus scrofa* (porco).

#### 4.5.3 - Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais com o kit AllHorse

Posteriormente, as amostras de ADN extraídas dos hambúrgueres comerciais foram igualmente testadas com o kit *tetraplex AllHorse*, por forma a identificar simultaneamente a presença de porco, cavalo e ovelha, em caso de fraude alimentar ou contaminação acidental. As amostras foram amplificadas juntamente com os controlos positivos para as quatro espécies diferentes, produzidos anteriormente, com a finalidade de descartar falsos negativos, em caso de inibição da PCR.

Pela análise da figura 39, verificamos que nenhuma das amostras comerciais testada apresentava qualquer outra das 3 espécies (porco, cavalo ou ovelha). Tal como indicado nos respectivos rótulos, a única espécie animal constituinte destes produtos alimentares era *Bos taurus* (vaca).



**Figura 39** - Amplificação, com o Kit *AllHorse*, do ADN extraído das amostras teste (Tabela 8), juntamente com os controlos positivos para cada espécie. *Bos taurus* (vermelho); *Sus scrofa* (verde); *Equus caballus* (azul); *Ovis aries* (roxo).

#### 4.5.4 - Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais com o *kit Veryfinder Equine Semi-Q Detection Assay*

O ADN extraído das amostras comerciais adquiridas foi posteriormente analisado com o *kit Veryfinder Equine Semi-Q Detection Assay*, por forma a confirmar a ausência de contaminações com ADN equíno. Este *kit* permite a detecção de ADN equíno através da amplificação de uma sequência genómica específica de *Equus caballus* com 95 pb. Além disso, este sistema de amplificação possui dois controlos internos, para carne crua e carne cozinhada.

Os resultados obtidos pela amplificação devem ser analisados segundo a tabela 22.

**Tabela 22** - Regras para análise dos resultados de amplificação. Adaptado de *Veryfinder Equine Semi-Q*.

Teste	ADN Equíno (FAM)	IAC (HEX)
Controlo Positivo	+	+
Amostra Positiva	+	+
Amostra Negativa	-	+

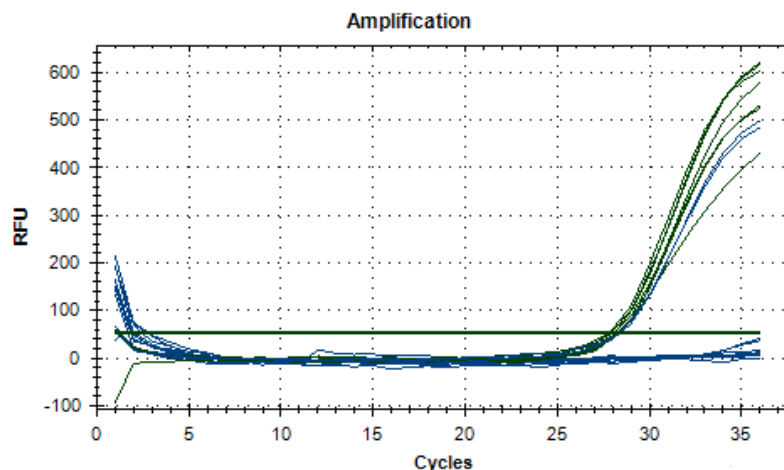
A amplificação das amostras, diluídas a 2 ng/μL, ocorreu assim simultaneamente com os controlos positivos do *kit* e dois controlos negativos, um para amplificação e um para extração.

Como podemos ver na figura 40, as amostras de ADN referentes aos hambúrgueres comerciais, aos controlos positivos do *kit* apresentaram curvas de amplificação para a fluorescência HEX, entre os 27,75 e 28,28 ciclos. Isto permite descartar falhas ou inibição do sistema de amplificação.

No que concerne os controlos negativos, estes não revelaram amplificação para qualquer uma das duas fluorescências. Estes resultados vão assim de encontro ao esperado, segundo a tabela 22.

Quanto à detecção de ADN equino (FAM), verificamos que este foi detetado em ambos os controlos positivos do *kit*, sem que se tenham verificado diferenças significativas entre os Ct do controlo positivo para carne crua (28,30) e cozinhada (28,41). Como se tinha verificado anteriormente com o *kit Tetraplex AllHorse*, as amostras de carne recolhidas dos hambúrgueres comerciais não apresentam vestígios de carne de cavalo.





**Figura 40** - Amplificação das amostras de hambúrgueres comerciais com o *Kit Verifinder Equine Semi-Q Assay*: ADN Equino (azul); IAC (verde).

#### 4.5.5 - Análise do ADN extraído das amostras de hambúrgueres comerciais teste, com o *kit Verifinder Swine Semi-Q Detection Assay*

O ADN extraído das amostras comerciais adquiridas foi ainda sujeito a análise pelo *kit Verifinder Detection Swine Semi-Q Assay*, por forma a confirmar que nenhuma amostra se encontrava contaminada com ADN suíno. Este *kit* permite a detecção de ADN suíno através da amplificação de uma sequência mitocondrial específica para *Sus scrofa* com 104 pb. Além disso, o *kit* possui dois controlos positivos para amostras cruas e cozinhadas.

Os resultados obtidos pela amplificação devem ser analisados segundo a tabela 23.

**Tabela 23** - Regras para análise dos resultados de amplificação. Adaptado de *Verifinder Swine Semi-Q Assay*.

Teste	ADN Suíno (FAM)	IAC (HEX)
<b>Controlo Positivo</b>	+	+
<b>Amostra Positiva</b>	+	+
<b>Amostra Negativa</b>	-	+

A amplificação das amostras, diluídas a 2 ng/μL, ocorreu assim simultaneamente com os controlos positivos do *kit*, e dois controlos negativos, um de amplificação e um de extração.

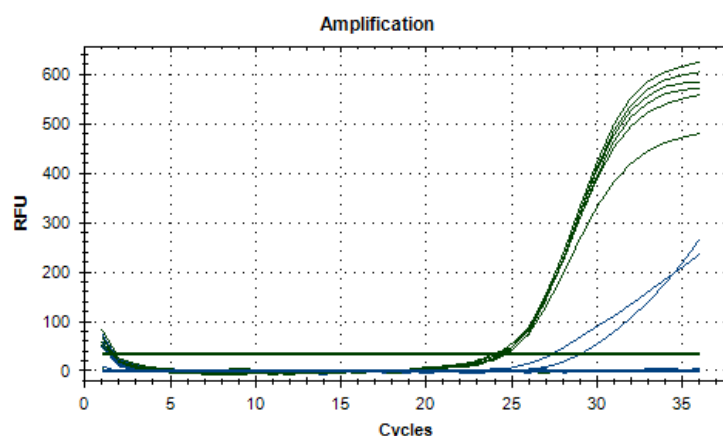
Como podemos ver na figura 41, as amostras positivas para ADN suíno, integrantes do *kit* de amplificação, amplificaram para ambas as fluorescências, o que confirma que não houve inibição

da amplificação e ADN suíno foi detetado em ambos os controlos, aos 25,29 ciclos no controlo positivo para carne crua e 27,21 ciclos para o controlo positivo para carne cozinhada.

Quanto aos controlos negativos, verificamos que nenhum apresentou amplificação para qualquer das fluorescências passíveis de serem detetadas.

Por fim, no que refere às amostras comerciais de hambúrgueres, todas amplificaram na fluorescência HEX, entre os 23,95 e os 24,68 ciclos, o que garante que não ocorreu inibição do sistema de amplificação.

Pela análise feita aos resultados da PCR, concluímos que, tal como anteriormente obtido na análise com o *kit tetrallex AllHorse* e com o sistema de amplificação constituído pelo *kit SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* e os *primers Pork*, não foi detetado ADN suíno nas amostras de hambúrgueres comerciais.



**Figura 41** - Amplificação das amostras de hambúrgueres comerciais com o *Kit Veryfinder Swine Semi-Q Assay*: ADN suíno (azul); IAC (verde).

## 5. Conclusões

O desenvolvimento desta dissertação baseou-se em três etapas distintas. Numa primeira fase, procedeu-se à avaliação de diferentes protocolos de extração de ADN, entre os quais o método de CTAB modificado, o método de Fenol-Clorofórmio, o protocolo de Wizard e o *kit* ilustra. Posteriormente avaliou-se a eficiência de diferentes *kits* de amplificação, para PCR em tempo real, *singleplex* e *tetraplex*. Estes dois primeiros pontos foram levados a cabo pela análise de quatro amostras controlo de quatro espécies diferentes: *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus* e *Ovis aries*. Por último, quatro amostras de hambúrgueres comerciais de bovino foram testadas, para a presença das outras três espécies de carne.

Para todos os portocolos de extração testados, os valores relativos à concentração foram ajustados por comparação à quantificação de uma amostra controlo de concentração 10 ng/μL (9947A DNA, Promega).

Através da análise dos valores de concentração e pureza do ADN extraído, obtida pelas razões de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , do estado de fragmentação do ADN em gel de agarose e da sua viabilidade para amplificação, concluímos que o método de CTAB modificado, desenvolvido por Stefanova *et al.* (2013), foi o que melhor se adequou à extração de ADN das amostras controlo desta experiência. Os extractos de ADN apresentavam valores de pureza elevados, reduzida fragmentação e foram correctamente amplificados com ambos os *kits*, em PCR convencional e posteriormente em qPCR com o *kit AllHorse*.

A avaliação da viabilidade do ADN para amplificação foi testada por PCR convencional, com o *kit* de amplificação Core kit e os *primers* universais 18S rARN (Fajardo *et al.*, 2008a) e num passo adicional por qPCR, com o *kit* tetraplex AllHorse (Koople *et al.*, 2011), com *primers* e sondas específicas para cada espécie, após optimização de ambos os protocolos de amplificação.

A partir deste ponto, todos os testes foram efectuados com as amostras de ADN extraído a partir do protocolo de CATB modificado.

Posteriormente, a metodologia por qPCR com o *kit* Sso Fast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix e os *primers* *Pork* (Dooley *et al.*, 2004) foi optimizada para a detecção específica e quantificação da espécie *Sus scrofa*. Para tal, este sistema de amplificação foi avaliado em termos de especificidade dos *primers*, por análise dos picos e da curva de *melting*, tendo-se verificado que todos os produtos de amplificação apresentavam a mesma temperatura de *melting*. A sensibilidade e especificidade da análise dos picos de *melting* foram já evidenciadas por Safdar *et al.* (2014) na identificação de quantidades reduzidas de ADN numa solução. Para mais, este sistema não apresentou reatividade cruzada com nenhuma das outras espécies em estudo. A sua sensibilidade foi avaliada pela amplificação de uma diluição em série (10X) de uma solução de ADN de *Sus scrofa* de

concentração inicial 50 ng/μL, verificando-se um limite de detecção de ADN de *Sus scrofa* de 0,001ng. Os valores da curva padrão obtida neste ensaio mostraram uma eficiência do sistema de amplificação de 103,7%, o que evidencia a eficácia deste sistema para a quantificação de *Sus scrofa*.

Seguidamente, o *kit* de amplificação AllHorse foi igualmente avaliado em termos de sensibilidade para o sistema de amplificação de *Sus scrofa*, segundo o protocolo descrito por Koppel *et al.* (2011). Desta forma, os extractos de ADN obtidos de todas as espécies foram sujeitos a diluições semi-logarítmicas e foram posteriormente simuladas misturas *standard*, com a finalidade de obter diferentes quantidades de ADN de *Sus scrofa*, numa base contendo ADN das outras três espécies em estudo. Verificamos que foi possível detetar porco presente numa mistura de ADN de diferentes espécies até 0,1 ng, ou seja o limite de detecção do *kit* AllHorse para o sistema de amplificação de *Sus scrofa* foi de 0,1%. Ainda que o sistema de amplificação permita a detecção de porco, a avaliação dos valores referentes à curva padrão, não permite extrapolar esta metodologia à análise quantitativa de *Sus scrofa* noutras amostras. Esta avaliação teria que ser feita com base num número mais significativo de amostras diluídas.

Numa etapa seguinte, realizou-se um inquérito à comunidade académica, por forma a apurar quais os tipos de produtos à base de carne processada eram mais consumidos pela mesma. Isto permitiu-nos direccionar o estudo para a avaliação de uma amostragem mais restrita de produtos comerciais. Assim, foram adquiridos quatro tipos de hambúrgueres de bovino de quatro marcas diferentes.

O ADN das amostras adquiridas foi extraído segundo o protocolo de CTAB modificado, sendo posteriormente avaliada a sua concentração e pureza. Verificamos que em média a concentração de ADN obtida foi ligeiramente inferior à concentração das amostras controlo, o que se justifica pela submissão das amostras comerciais a algum tipo de processamento aquando da sua confecção. No entanto, entre as quatro amostras comerciais testadas, considerando que o grau de processamento é superior em duas delas (amostras A1 e A2), não se verificaram diferenças substanciais entre os valores de concentração. No que concerne aos valores de pureza foram de encontro aos obtidos com as amostras controlo. Tal como nas amostras controlo, os valores de concentração de ADN obtido, foram ajustados por comparação com os valores de uma amostra controlo de concentração 10 ng/μL (9947<sup>a</sup> DNA, Promega).

O ADN extraído foi posteriormente amplificado com os sistemas *Sso Fast Eva<sup>TM</sup> Green<sup>®</sup>* e os *primers* *Pork* e o *kit tetraplex AllHorse*, para a detecção de *Sus scrofa*, com o primeiro, e de *Sus scrofa*, *Bos taurus* e *Equus caballus*, com o segundo. A amplificação foi sempre efectuada com controlo positivos, obtidos da extração de ADN das amostras controlo, na diluição de 2 ng/μL, e controlos negativos de extração e amplificação, por forma a descartar falsos negativos, resultantes da inibição da PCR. De todas as amostras analisadas nenhuma revelou a presença de qualquer outra

espécie além da indicada no rótulo do produto alimentar, pelo que não se procedeu à quantificação posterior da mesma.

Por último, as amostras comerciais de hambúrgueres de bovino foram testadas com dois *kits* de amplificação baseados na detecção de fluorescência de sondas, *Veryfinder Equine Semi-Q Detection Assay* e *Veryfinder Swine Semi-Q Detection Assay*, que incluem controlos positivos para carne crua e cozinha, detetados na fluorescência FAM e um controlo interno de amplificação (IAC) detetado na fluorescência HEX. Além dos controlos internos positivos inerentes aos *kits*, foram igualmente utilizados controlos negativos de extração e amplificação. Nenhum dos *kits* revelou a presença de ADN equino ou suíno, respectivamente, tal como já tinha sido evidenciado pelos *kits* de amplificação anteriormente optimizados e testados, o que mais uma vez comprova que das amostras comerciais analisadas, todas vão de encontro ao descrito nos rótulos das embalagens.

Através de metodologias de biologia molecular foi assim possível verificar a autenticidade de alguns produtos alimentares.

Ainda que mais análises possam ser executadas, por forma melhorar as técnicas testadas, numa avaliação global, estas mostraram ter aplicabilidade na monitorização de alimentos processados, considerando uma análise qualitativa, ou seja de presença ou ausência das espécies analisadas. Além disso, revelaram limites de detecção bastantes baixos, o que associado a uma relação tempo/custo relativamente plausível, torna estas metodologias aceitáveis para a finalidade em questão. No que concerne à avaliação quantitativa, somente o sistema de amplificação *Sso Fast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix* mostrou ser realmente adequado. Já o *Kit tetraplex AllHorse*, ao apresentar uma eficiência de amplificação 117,7% e um coeficiente de relação baixo (0,969), revela que um número superior de diluições em séries teria que ser avaliado, para que uma relação mais validada pudesse ser formulada relativamente à sua aplicação na quantificação das espécies em estudo em amostras alimentares comerciais analisadas.

Como perspectivas futuras, é de extrema importância a optimização e definição de um protocolo global de homogeneização das amostras, por forma a aumentar a concentração de ADN extraído por amostra. Além disso, é necessário aplicar os protocolos de amplificação testados e optimizados num maior número de amostras comerciais, com intuito de aumentar a garantia da sua aplicabilidade em possíveis análises de rotina.

Em forma de conclusão, é essencial referir a relevância do desenvolvimento de metodologias de simples e rápida execução para a avaliação da autenticidade de produtos alimentares, de forma a preservar as suas propriedades e identidade, protegendo assim os consumidores e os produtores que detêm uma atitude laboral e comercial legítima.



## 6. Bibliografia

- Ali, M. E., Kashif, M., Uddin, K., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. B. C. (2012). Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. *Food Analytical Methods*, 5(5), 935-955.
- Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. C., Dhahi, T. S., Kashif, M., Hamid, S. A. (2012). Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat science*, 91(4), 454-459.
- Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. B. C. (2012). Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome B gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products. *Food Analytical Methods*, 5(3), 613-623.
- Amaral, J. S., Santos, C. G., Melo, V. S., Oliveira, M. B. P., Mafra, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. *Food Research International*, 60, 140-145.
- Amaral, J. S., Costa, J., Mafra, I., Oliveira, M. B. P. (2015) Autenticação de produtos cárneos com a designação Halal: Detecção e quantificação de derivados de suíno (*Sus scrofa*). *Riscos e Alimentos* (9), 11 – 13.
- Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Al Farhan, A. H., Al Homaidan, A. A., Bahkali, A. H., Shobrak, M. (2010). A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International journal of molecular sciences*, 11(5), 2079-2096.
- A Technical Guide to PCR Technologies. SigmaAldrich®
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., Karlsson, A. H. (2009). Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration?. *Meat Science*, 83(2), 165-174.
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., Karlsson, A. H. (2012). PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification. *Meat science*, 90(2), 438-443.
- Binnie, M. A., Barlow, K., Johnson, V., Harrison, C. (2014). Red meats: time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat science*, 98(3), 445-451.
- Bosona, T., & Gebresenbet, G. (2013). Food traceability as an integral part of logistics management in food and agricultural supply chain. *Food control*, 33(1), 32-48.
- Bottero, M. T., Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190(1), 34-38.

Brodmann, P. D., Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Science*, 65(1), 599-607.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.

Cammà, C., Di Domenico, M., Monaco, F. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23(2), 400-404.

Chisholm, J., Sánchez, A., Brown, J., Hird, H. (2008). The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food Analytical Methods*, 1(3), 190-194.

Commission Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Union, L 268, 1-37.

Datukishvili, N., Gabriadze, I., Kutateladze, T., Karseladze, M., & Vishnepolsky, B. (2010). Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops. *International journal of food science & technology*, 45(6), 1316-1320.

Dabbene, F., & Gay, P. (2011). Food traceability systems: Performance evaluation and optimization. *Computers and Electronics in Agriculture*, 75(1), 139-146.

Demirhan, Y., Ulca, P., Senyuva, H. Z. (2012). Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products—Halal/Kosher authentication. *Meat science*, 90(3), 686-689.

Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D., Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68(3), 431-438.

Ellis, D. I., Muhamadali, H., Haughey, S. A., Elliott, C. T., Goodacre, R. (2015). Point-and-shoot: rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis—moving out of the laboratory and into the food supply chain. *Analytical Methods*.

Estatísticas Agrícolas. Instituto Nacional de Estatística, Edição 2014. Pg.31

European Commission (2001) Directive 2001/101/EC of 26 November 2001 amending Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. Official Journal of the European Communities L 310:19–21



- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., Martín, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat science*, 79(2), 289-298.
- Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 408-421.
- Farrokhi, R., Jafari Joozani, R. (2011). Identification of pork genome in commercial meat extracts for Halal authentication by SYBR green I real-time PCR. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 951-955.
- Gasser, R. B., Hu, M., Chilton, N. B., Campbell, B. E., Jex, A. J., Otranto, D., Zhu, X. (2006). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*, 1(6), 3121-3128.
- Gryson, N., Messens, K., Dewettinck, K. (2004). Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1357-1363.
- Guanidine hydrochloride. ProductInformation, Sigma®
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
- Introduction to Quantitative PCR. Methods and Application Guide. Agilent Technologies (2012). Pg. 4-55.
- Iotti, M., Leonardi, M., Oddis, M., Salerni, E., Baraldi, E., & Zambonelli, A. (2012). Development and validation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Tuber magnatum* in soil. *BMC microbiology*, 12(1), 93.
- Kane, D. E., Hellberg, R. S. (2015). Identification of Species in Ground Meat Products Sold on the US Commercial Market using DNA-Based Methods. *Food Control*.
- Kashani, A., Malau-Aduli, A. E. O. (2014). Real-Time PCR and Real-Time RT-PCR applications in food labelling and gene expression studies. *International Journal of Genetics and Genomics*, 2, 6-12.
- Köppel, R., Zimmerli, F., Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology*, 230(1), 125-133.

- Köppel, R., Ruf, J., Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology*, 232(1), 151-155.
- Köppel, R., Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J. (2012). Quantification of meat proportions by measuring DNA contents in raw and boiled sausages using matrix-adapted calibrators and multiplex real-time PCR. *Journal of AOAC International*, 95(2), 494-499.
- Laube, I., Spiegelberg, A., Butschke, A., Zagon, J., Schauzu, M., Kroh, L., Broll, H. (2003). Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *International journal of food science & technology*, 38(2), 111-118.
- Lin, C. C., Fung, L. L., Chan, P. K., Lee, C. M., Chow, K. F., Cheng, S. H. (2014). A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat science*, 96(2), 922-929.
- Lotta, F., Bogue, J. (2015). Defining Food Fraud in the Modern Supply Chain. *Eur. Food & Feed L. Rev.*, 114.
- Mafra, I., Silva, S. A., Moreira, E. J., da Silva, C. S. F., Beatriz, M., Oliveira, P. P. (2008). Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*, 19(12), 1183-1190.
- Meira L., Mafra I., Costa J., Amaral J. S., Ramos F., Oliveira M. B. P. P. (2014) “Novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo.” *Riscos e Alimentos* (9), 4 – 7.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetic*.
- Mohamad, N. A., El Sheikha, A. F., Mustafa, S., Mokhtar, N. F. K. (2013). Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, 50(1), 330-338.
- Muhammed, M. A., Bindu, B. S. C., Jini, R., Prashanth, K. H., Bhaskar, N. (2015). Evaluation of different DNA extraction methods for the detection of adulteration in raw and processed meat through polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 514-520.
- Mukhtar, A., & Mohsin Butt, M. (2012). Intention to choose Halal products: the role of religiosity. *Journal of Islamic Marketing*, 3(2), 108-120.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17-17.
- Nanodrop, Technical Support Bulletin, 2007.

Opara, L. U. (2003). Traceability in agriculture and food supply chain: a review of basic concepts, technological implications, and future prospects. *Food, Agriculture and Environment*, 1(1), 101e106.

Overview of ELISA (Thermo Fisher Scientific).

Pirondini, A., Bonas, U., Maestri, E., Visioli, G., Marmiroli, M., Marmiroli, N. (2010). Yield and amplifiability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. *Food Control*, 21(5), 663-668.

Prado, M., Fumière, O., Boix, A., Marien, A., Berben, G., von Holst, C. (2009). Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(5), 1423-1431.

Primrose, S., Woolfe, M., Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 582-590.

Psifidi, A., Dovas, C. I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C. L., Arsenos, G., Banos, G. (2015). Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. *PloS one*, 10(1), e0115960.

Rahman, M. M., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Mustafa, S., Hashim, U., Hanapi, U. K. (2014). Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation. *Meat science*, 97(4), 404-409.

Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories (2006). Pg. 2-6

Real-Time PCR Vs Traditional PCR – Applied Biosystems. Pg.4

Ressmann, A. K., García, E. G., Khlan, D., Gaertner, P., Mach, R. L., Krska, R., ... & Bica, K. (2015). Fast and efficient extraction of DNA from meat and meat derived products using aqueous ionic liquid buffer systems. *New Journal of Chemistry*.

Rey, Y. (2014). Food Fraud – Threats & Impacts.

Rogberg-Muñoz, A., Wei, S., Ripoli, M. V., Guo, B. L., Carino, M. H., Castillo, N., Giovambattista, G. (2014). Foreign meat identification by DNA breed assignment for the Chinese market. *Meat science*, 98(4), 822-827.

Rojas, M., González, I., Pavón, M. Á., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., Martín, R. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Additives and Contaminants*, 27(6), 749-763.

- Safdar, M., Junejo, Y. (2015). A multiplex-conventional PCR assay for bovine, ovine, caprine and fish species identification in feedstuffs: Highly sensitive and specific. *Food Control*, 50, 190-194.
- Safdar, M., Junejo, Y., Arman, K., Abasiyanik, M. F. (2014). A highly sensitive and specific tetraplex PCR assay for soybean, poultry, horse and pork species identification in sausages: Development and validation. *Meat science*, 98(2), 296-300.
- Safdar, M., Junejo, Y., Arman, K., Abasiyanik M. F. (2014). Rapid Bovine and Caprine species Identification in Ruminant Feeds by Duplex Real-Time PCR Melting Curve Analysis Using EvaGreen Fluorescence Dye. *Molecular Biotechnology*, 56(8):770-776.
- Safdar, M., Abasiyanik M. F. (2013). Simultaneous Identification of Pork and Poultry Origins in Pet Foods by Quick Multiplex Real-Time PCR Assay Using EvaGreen Fluorescence Dye. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7):1855-1864.
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., Tsiftaris, A. (2013). A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Meat science*, 94(1), 84-88.
- Sentandreu, M. Á., Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International*, 60, 19-29.
- Serang, O., Noble, W. S. (2012). Faster mass spectrometry-based protein inference: junction trees are more efficient than sampling and marginalization by enumeration. *Computational Biology and Bioinformatics, IEEE/ACM Transactions on*, 9(3), 809-817.
- Smabrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Volume 1. (1989).
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat science*, 94(1), 115-120.
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., Mafra, I. (2014). Quantitative detection of soybean in meat products by a TaqMan real-time PCR assay. *Meat science*, 98(1), 41-46.
- Sol, M., Alberty, A. R., Mâncio, I., Machado, T. (2015) " Detecção de fraudes alimentares em carne-análise de ADN." *Riscos e Alimentos* (9), 8 - 10.
- Somma, M. (2006). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Stefanova, P., Taseva, M., Georgieva, T., Gotcheva, V., & Angelov, A. (2013). A modified CTAB method for DNA extraction from soybean and meat products. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(3), 3803-3810.

- Storøy, J., Thakur, M., & Olsen, P. (2013). The TraceFood Framework—Principles and guidelines for implementing traceability in food value chains. *Journal of food engineering*, 115(1), 41-48.
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 265-293.
- Tung Nguyen, C.T., Son, R., Raha, A.R., Lai, O.M. & Clemente Michael, W.V.L. (2009). Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *International Food Research Journal*, 16, 21– 30.
- Son, R., Raha, A. R., Oi, M. L., Wong, C. M. V. L. (2009). Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *International Food Research Journal*, 16(1).
- Ulca, P., Balta, H., Çağın, İ., Senyuva, H. Z. (2013). Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat science*, 94(3), 280-284.
- University of Northern British Columbia, “Gene Expression”. Página Consultada a 28 de setembro de 2015, < <http://www.unbc.ca/genetics/training/gene-expression>>.
- VERYfinder Detection Assay Equine Semi-Quantitative, User Guide (2014). Generon. Advanced Transfer Technologies.
- VERYfinder Detection Assay Swine Semi-Quantitative, User Guide (2014). Generon. Advanced Transfer Technologies.
- Which? (2013) “Horsemeat scandal dents trust in food industry. Consumers confidence has dropped by a quarter.” 13 de março. Página consultada a 25 de fevereiro de 2015 < <http://press.which.co.uk/whichpressreleases/horsemeat-scandal-dents-consumer-confidence-in-food-industry/>>.
- Yamoah, F. A., Yawson, D. E. (2014). Assessing Supermarket Food Shopper Reaction to Horsemeat Scandal in the UK. *International Review of Management and Marketing*, 4(2), 98-107.
- Yang, L., Fu, S., Peng, X., Li, L., Song, T., Li, L. (2014). Identification of pork in meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(5), 882-888.
- Yusop, M. H. M., Mustafa, S., Man, Y. B. C., Omar, A. R., Mokhtar, N. F. K. (2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome B gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction. *Food Analytical Methods*, 5(3), 422-429.
- Zha, D., Xing, X., Yang, F. (2010). A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. *Food Control*, 21(10), 1402-1407.

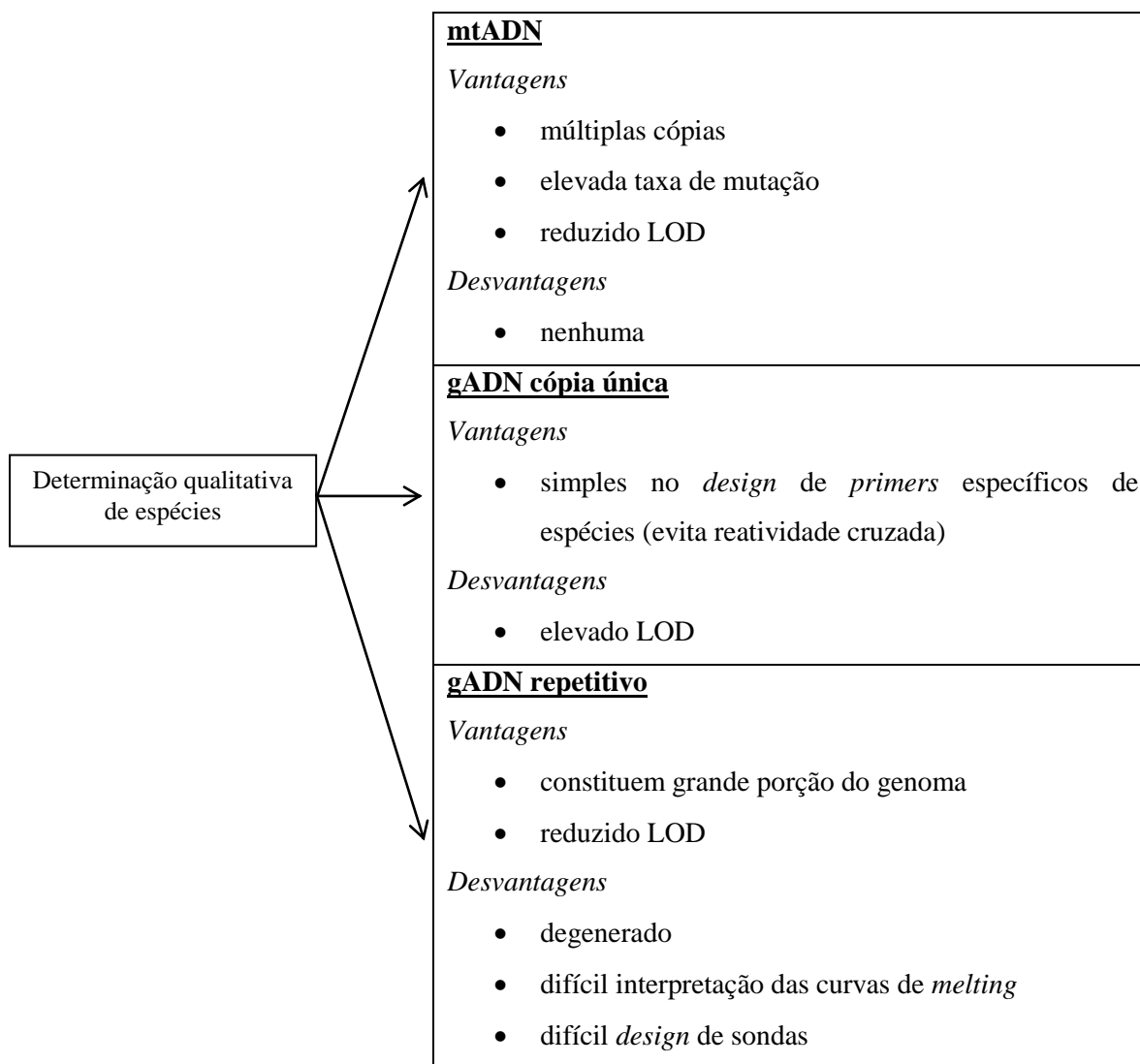


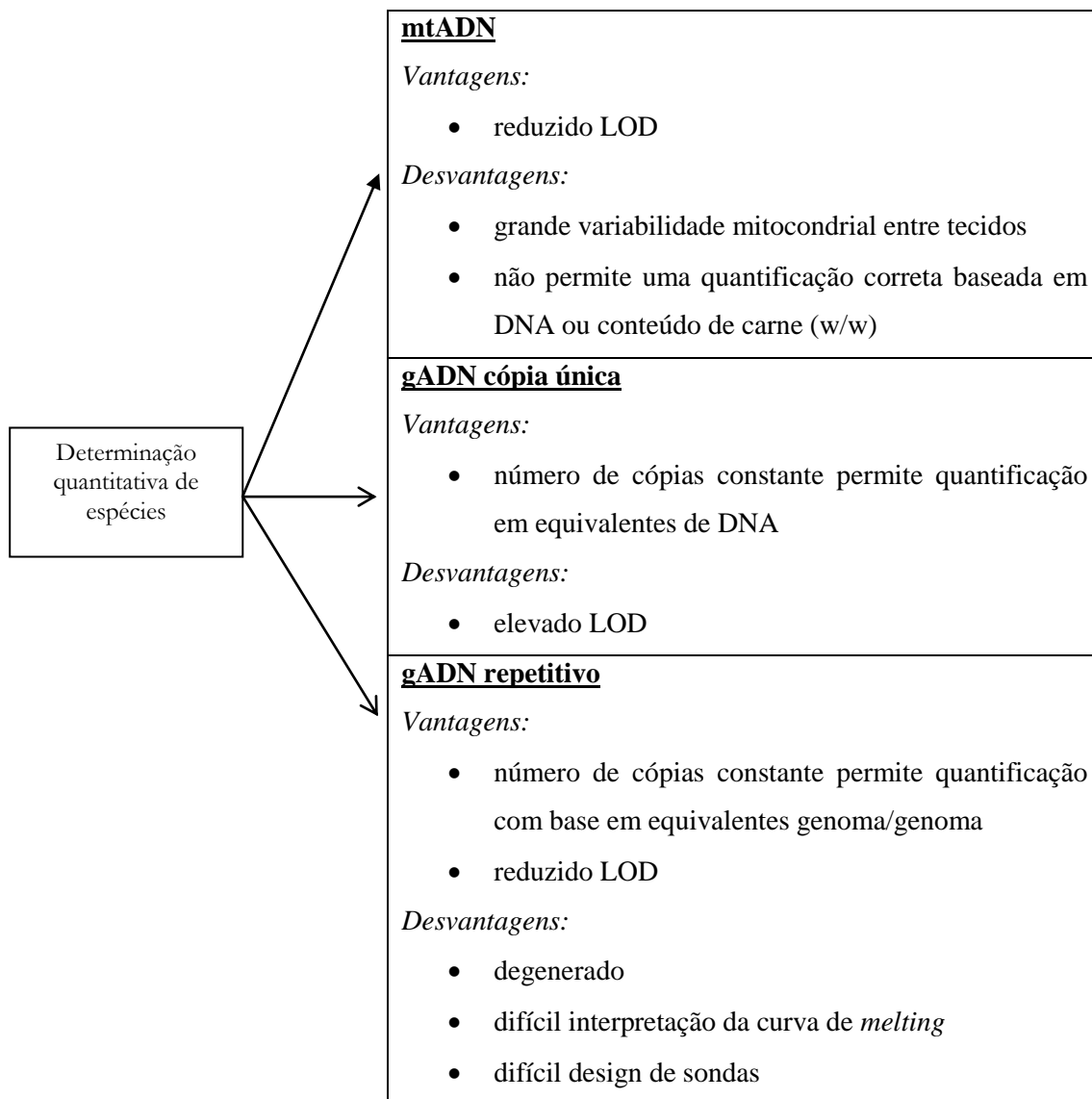
## **Anexos**





**Anexo I** - Visão geral das vantagens e desvantagens na determinação de espécies, baseado na PCR qualitativa e quantitativa. Adaptado de Ballin *et al.*, (2009).





**Anexo II - Vantagens e desvantagens de diversos genes alvo. Adaptado de Mohamad *et al.* (2013).**

Localização	Gene	Vantagens	Desvantagens
<b>mtADN</b>	Citocromo b	Elevada variabilidade interespécies	Baixa variabilidade interespécies
	12 S rARN	Variabilidade inter e intraespécies	
	Região <i>D-loop</i>	Elevada taxa de substituição; região do mtADN que mais rápido evolui	
	ND5	Elevada variabilidade interespécies	
	ND2	Variabilidade inter e intraespécie	
	ATPase6/ATPase8	Variabilidade interespécies	Baixa variabilidade interespécies
	16S rARN	Contém regiões conservadas; baixa variabilidade interespécies	
<b>gADN</b>	SINE	Elevada variabilidade interespécies	Baixa variabilidade interespécies
	GMP cíclico	Elevada variabilidade interespécies	Baixa variabilidade interespécies
	Fosfodiesterase		
	Recetor da rianodina		
	Percursor IL-2		
	MCIR	Sequências altamente polimórficas; elevada variabilidade interespécies	Variabilidade interespécies varia consoante as espécies
	Miostatina	Baixa variabilidade inter e intraspécies	
	18S rARN	Regiões conservadas entre os eucariotas; baixa variabilidade interespécies	
	Hormona do Crescimento	Contém regiões conservadas e regiões com variabilidade genética entre mamíferos	



**Anexo III – Declaração comprovativa da autenticidade das amostras de carne analisadas e identificadas por etiquetas (Anexo IV).**

**Declaração da Veracidade de Produtos Cárneos**

Suzana Maria Alves Soares,  
portador do bilhete de identidade/cartão de cidadão nº 08469441, emitido em  
1/1, declara que os produtos adquiridos no estabelecimento "Talho do Centro",  
no dia 18/07/2015, correspondem às espécies solicitadas pelo cliente, abaixo indicadas e  
côm etiqueta de identificação, em anexo.

*Bos taurus* (Vaca)

*Sus scrofa* (Porco)

*Equus caballus* (Cavalo)

*Ovis aries* (Ovelha)

Declara ainda, sob compromisso de honra, que todas as normas, referentes a condições  
de higiene do espaço e armazenamento e manipulação dos produtos, são cumpridas e  
que o estabelecimento é regularmente avaliado por entidades acreditadas, que  
reconhecem a capacidade necessária ao cumprimento da função.

Suzana Maria Alves Soares, 26 de setembro de 2015.

 **TALHO DO CENTRO**  
**FONTE DE SUSTENTO**  
LDA.  
(Assinatura conforme documento de identificação)



**Anexo IV – Etiquetas de identificação de autenticação dos animais de origem das amostras de carne de talho analisadas.**

Espécies	Etiqueta de Identificação
<i>Equus caballus</i>	<p>Matadouro Regional Beira Serra <span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px;">PT B-06 CE</span></p> <hr/> <p>Identificação do animal:</p> <p>Origem: <b>PORTUGAL</b></p> <p>Abatido em: <b>PORTUGAL PT-B-06-CE</b></p> <p><b>00010001</b> DESTINATÁRIO: <b>0100331</b></p> <p>Data: <b>09/2015</b></p> <p>Class: <b>P.L.:MEIA/INTEIRA</b></p> <p><b>108,58 / 217,75Kg</b> Idade Meses: <b>0</b></p> 
<i>Ovis aries</i>	<p><b>OVIGER, S.A.</b></p> <p>Apartado 71 - Estrada de S.Domingos - 3010 ALCAINS - Telef. 272 907 928 - Fax. 272 906 428</p> <p>Nascido: <b>PORTUGAL</b> Criado: <b>PORTUGAL</b></p> <p>Abatido: <b>PORTUGAL PTI 30 CE</b></p> <p>Classificação: <b>AR2</b> Brinco: <b>PT018218351</b></p> <p>Raça: <b>CRUZCARNE</b> Cliente: <b>001944</b></p> <p>C. Referência: <b>1538 0070</b> Destino: <b>002101</b></p>  <p>&lt;91&gt;BCA 1538 0070</p>
<i>Bos taurus</i>	<p><b>MBS</b> Identificação: <b>00150006</b> <b>000141</b></p> <p><b>01.00331</b></p> <p>Criado em: <b>PORTUGAL</b> <span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px;">PT B_06 CE</span></p> <p>Abatido em: <b>PORTUGAL</b></p> <p><b>15IF2100150006</b></p> <p><b>PESO LIQUIDO: 7,40Kg</b></p> <p>Classif: <b>*****</b></p> <p><b>M</b></p>
<i>Sus scrofa</i>	<p>Sequência <b>531</b> Identificação: <b>00300059 -</b></p> <p>Criado em: <b>PORTUGAL</b></p> <p>Abatido em: <b>PT</b></p> <p><b>PORTUGAL 74-CE</b></p> <p>Classif: <b>S</b></p> 